

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Metabolismo lipídico en conejos : aportaciones sobre la
composición lipídica y regulación enzimática en tejidos
adultos y fetales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

José Castro Pérez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID ⁵⁴⁴⁴ CAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Serie A-n.º 229



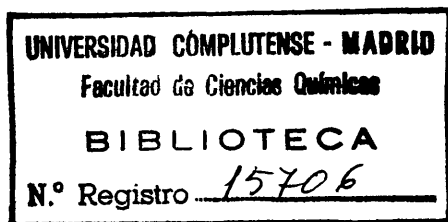
SECCION DE QUIMICAS

METABOLISMO LIPIDICO EN CONEJOS
APORTACIONES SOBRE LA
COMPOSICION LIPIDICA
Y REGULACION ENZIMATICA
EN TEJIDOS ADULTOS Y FETALES

TESIS DOCTORAL

por

JOSE CASTRO PEREZ



Publicaciones de la Facultad de Ciencias
MADRID, 1975

ISBN - 84 - 600 - 1791 - 5

Depósito Legal: M. 9.688 - 1975

Impreso por el Servicio de Publicaciones de la Facultad de Ciencias
Universidad Complutense de Madrid

El presente trabajo se ha llevado a cabo en los laboratorios del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del profesor D. Angel Martin Municio, a quien va dirigido mi agradecimiento por su valiosa ayuda.

I N D I C E

1. PARTE TEORICA

METABOLISMO DE LIPIDOS EN MAMIFEROS Y SU REGULA- CION. INFLUENCIA DE GESTACION Y HORMONAS.

	<u>Página</u>
1.1 INTRODUCCION	13
1.2 BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS	15
1.2.1 Síntesis citoplásmica	15
1.2.2 Síntesis mitocondrial	18
1.2.3 Síntesis microsomal	20
1.2.4 Síntesis de ácidos grasos insaturados ...	20
1.3 REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS .	22
1.3.1 Control de las enzimas de la biosíntesis de ácidos grasos	22
1.3.2 Control de la síntesis de ácidos grasos ejercido por los niveles de nucleótidos reducidos	25
1.4. BIOSINTESIS DE TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS ...	27
1.4.1 Mecanismo de biosíntesis "de novo"	27
1.4.2 Mecanismo de metilación	30
1.4.3 Mecanismo desacilación-reacilación	31
1.4.4 Mecanismo de intercambio de bases nitro- genadas	32
1.5 BIOSINTESIS DE ESPECIES MOLECULARES DE FOS- FOLIPIDOS	33
1.6 INFLUENCIAS EXOGENAS SOBRE LA COMPOSICION Y DISTRIBUCION DE ACIDOS GRASOS EN LIPIDOS	37

	<u>Página</u>
1.7 METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEINAS PLASMATICAS ...	39
1.7.1 Síntesis hepática de las lipoproteínas ...	39
1.7.2 Síntesis de quilomicrones y VLDL en la mucosa intestinal	40
1.7.3 Catabolismo de quilomicrones y VLDL	41
1.7.4 Catabolismo de HDL y LDL	43
1.8 REGULACION DEL METABOLISMO LIPIDICO	44
1.8.1 Aspectos generales del flujo de triglicé- ridos y su control, en mamíferos	44
1.8.2 Lipólisis y su regulación. Estudio de los sistemas adenil-ciclasa	47
1.8.3 Acciones de la insulina sobre el meta- bolismo de lípidos	54
1.8.3.1 Efecto sobre los niveles de lípi- dos plasmáticos	54
1.8.3.2 Efecto sobre la síntesis hepática de ácidos grasos	54
1.8.3.3 Efecto sobre la síntesis de trigli- cêridos de hígado y plasma	56
1.8.3.4 Efecto sobre la utilización de triglicêridos plasmáticos	57
1.9 INFLUENCIA DE LA GESTACION SOBRE EL METABOLIS- MO DE LIPIDOS	59
1.9.1 Modificaciones cuantitativas de los lípi- dos plasmáticos	59
1.9.2 Influencias hormonales	61
1.9.3 Biosíntesis de lípidos	68
1.9.4 Acidos grasos de plasma y tejido adiposo .	71
1.10 PERMEABILIDAD DE LA PLACENTA. ORIGEN DE LOS LIPIDOS FETALES	72
1.10.1 Origen de los triglicêridos fetales	75
1.10.2 Origen del colesterol fetal	76
1.10.3 Origen de los fosfolípidos fetales	77
1.10.4 Origen de los ácidos grasos fetales	79
1.10.5 Origen de las lipoproteínas del plas- ma fetal	81
1.11 ALGUNOS ASPECTOS SOBRE LAS RELACIONES HORMONAL- LES MATERNO-FETALES	82

	<u>Página</u>
1.12 METABOLISMO LIPIDICO FETAL	86
1.12.1 Importancia del metabolismo de lípidos para el feto	86
1.12.2 Concentración de lípidos y composición de ácidos grasos durante el desarrollo .	86
1.12.3 Biosíntesis de lípidos	89
1.12.4 Degradación de lípidos	95
1.12.5 Influencias hormonales durante el desa rrollo fetal	96
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1 MATERIAL BIOLOGICO	103
2.2 ADMINISTRACION DE INSULINA	103
2.3 ANALISIS CUANTITATIVO DE LIPIDOS DE SUERO	103
2.3.1 Aislamiento de lípidos totales	104
2.3.2 Cromatografía en capa fina	105
2.3.3 Análisis cuantitativo de fosfolípidos ...	107
2.3.3.1 Análisis de clases de fosfolí pidos	107
2.3.3.2 Análisis de fosfolípidos totales .	110
2.3.4 Análisis cuantitativo de triglicéridos ..	111
2.3.5 Análisis cuantitativo de ácidos grasos libres	112
2.3.6 Análisis cuantitativo de colesterol to tal	113
2.3.7 Análisis de lipoproteínas	114
2.4 EXTRACCION DE LIPIDOS TOTALES DE TEJIDOS	114
2.4.1 Separación cromatográfica de los lípi dos totales de tejidos	115
2.5 ANALISIS DE ACIDOS GRASOS TOTALES Y DE TRIGLI CERIDOS Y FOSFOLIPIDOS DE TEJIDOS. OBTENCION DE ESTERES METILICOS Y ANALISIS	116
2.6 HIDROLISIS ENZIMATICA DE FOSFOLIPIDOS PARA ESTUDIAR LA DISTRIBUCION POSICIONAL DE ACI DOS GRASOS	118

2.7	HIDROLISIS DE TRIGLICERIDOS CON LIPASA PANCREATICA PARA ESTUDIAR LA DISTRIBUCION PARCIAL DE ACIDOS GRASOS	119
2.8	METODOS DE ANALISIS ENZIMATICOS	121
2.8.1	Análisis de la actividad acetil-CoA carboxilasa de hígado	121
2.8.2	Análisis de la actividad ácido graso-sintetasa de hígado	122
2.8.3	Actividad adenil-ciclase de tejidos	123
2.8.3.1	Medios de incubación	124
2.8.3.2	Incubación	127
2.8.3.3	Separación cromatográfica y conteo del AMP cíclico	128
2.9	VALORACION DE PROTEINAS	129

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1	EFFECTO DE LA GESTACION Y ADMINISTRACION DE INSULINA SOBRE LOS NIVELES DE LIPIDOS EN SUERO DE CONEJO	133
3.2	EFFECTO DE LA GESTACION Y ADMINISTRACION DE INSULINA SOBRE LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE DIFERENTES CLASES DE LIPIDOS DE HIGADO EN CONEJOS	142
3.3	EFFECTO DE LA GESTACION Y ADMINISTRACION DE INSULINA SOBRE LA DISTRIBUCION DE ACIDOS GRASOS EN FOSFATIDILCOLINA DE HIGADO Y PULMON MATERNOS Y FETALES EN CONEJOS	149
3.4	INFLUENCIA DE LA GESTACION Y ADMINISTRACION DE INSULINA SOBRE LA DISTRIBUCION DE ACIDOS GRASOS EN FOSFATIDILETANOLAMINA DE HIGADO Y PULMON MATERNOS Y FETALES EN CONEJOS	156
3.5	INFLUENCIA DE LA GESTACION Y ADMINISTRACION DE INSULINA SOBRE LA DISTRIBUCION PARCIAL DE ACIDOS GRASOS EN TRIGLICERIDOS DE HIGADO Y PULMON MATERNOS Y FETALES EN CONEJOS	162

3.6	ESTUDIOS "IN VITRO" DE LAS ENZIMAS DE LA BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS Y SU REGULACION EN CONEJOS	169
3.6.1	Estudio comparativo de la actividad de acetil-CoA carboxilasa y de los mecanismos de biosíntesis de ácidos grasos en hígado adulto y fetal en conejos. Influencia de la administración de insulina	169
3.6.2	Influencia de los nucleótidos reducidos de piridina sobre la actividad de acetil-CoA carboxilasa y la síntesis de ácidos grasos	171
3.6.3	Influencia de malonil-CoA sobre la actividad de acetil-CoA carboxilasa y la síntesis de ácidos grasos. Efecto de avidina	173
3.7.	ADENIL CICLASA EN TEJIDOS DE CONEJO	181
3.7.1	Estudios previos	181
3.7.2	Influencia de la concentración de proteínas en el medio de incubación sobre la formación de AMP cíclico	182
3.7.3	Actividad adenil-ciclase en tejido adiposo e hígado de conejas control. Influencia de la concentración de ATP y activación por fluoruro	183
3.7.4	Influencia de la gestación sobre la actividad de adenil-ciclase	184
4.	RESUMEN Y CONCLUSIONES	193
5.	BIBLIOGRAFIA	203

1. P A R T E T E O R I C A

METABOLISMO DE LIPIDOS EN MAMIFEROS Y SU REGULACION.

INFLUENCIA DE GÆSTACION Y HORMONAS.

1.1. INTRODUCCION.

En los últimos años se han realizado progresos sustanciales en el conocimiento de los mecanismos de la absorción intestinal de lípidos, la actividad metabólica del tejido adiposo, las actividades enzimáticas que regulan la síntesis y utilización de ácidos grasos y las relaciones dinámicas que existen entre las diferentes rutas metabólicas de lípidos, hidratos de carbono y proteínas. Es un hecho bien conocido que en un organismo normal los ácidos grasos libres constituyen una de las principales fuentes de energía y que en ciertas enfermedades clásicamente atribuidas a un error en el metabolismo de hidratos de carbono (diabetes, estados prediabéticos, ciertas formas de obesidad, etc.), las alteraciones de metabolismo de lípidos son de primaria importancia y pueden jugar un papel patológico de primer orden. Evidentemente, desde el punto de vista clínico, además de todas estas anomalías hay que considerar las que afectan de forma primaria al metabolismo lipídico en sus distintos aspectos de absorción, transporte y metabolismo intermediario, y de cuya importancia son ilustrativas, por citar un ejemplo, las diferentes lipoproteinemias con su amplio cuadro de incidencias a nivel clínico.

Es un hecho clásicamente conocido que la gestación produce cambios notables en el metabolismo intermediario; existe actualmente una gran abundancia de literatura científica que se refiere a cuestiones tales como la "influencia diabetógena" de la gestación, la "prediabetes de embarazo" y otros complejos problemas tanto fisiológicos co

mo clínicos.

Si hasta hace relativamente poco tiempo las investigaciones de esta naturaleza se habían realizado fundamentalmente sobre el metabolismo de hidratos de carbono, actualmente se considera que muchas de las citadas alteraciones tienen lugar a nivel de otros esquemas metabólicos, y concretamente el metabolismo de lípidos, que se ha transformado así en un objetivo de gran importancia.

En pediatría es un problema muy frecuente el predecir los efectos sobre el feto de diferentes trastornos en docrinos de la madre durante la gestación, lo que requiere el conocimiento de las relaciones hormonales materno-fetales. Además de la madre y el feto, el otro elemento esencial en este sistema es la placenta: no sólo regula el intercambio de sustancias entre las circulaciones materna y fetal sino que es un centro esencial en la producción de hormonas.

La importancia del metabolismo lipídico pulmonar se ha hecho patente a través de las investigaciones realizadas en los últimos años, sobre todo desde el descubrimiento de que la actividad superficial del pulmón radica en determinadas fracciones lipídicas y se considera actualmente que la sustancia responsable de la actividad superficial pulmonar es un fosfolípido, la dipalmitoil-3-sn-fosfatidilcolina. Este fosfolípido, a diferencia de la mayoría de los fosfolípidos que se encuentran en tejidos de mamíferos, es simétrico respecto a sus ácidos grasos constituyentes. Por otra parte, la presencia de dos ácidos grasos saturados favorece su resistencia al oxígeno, a diferencia de la mayoría de los fosfolípidos en los que la posición 2 es altamente insaturada.

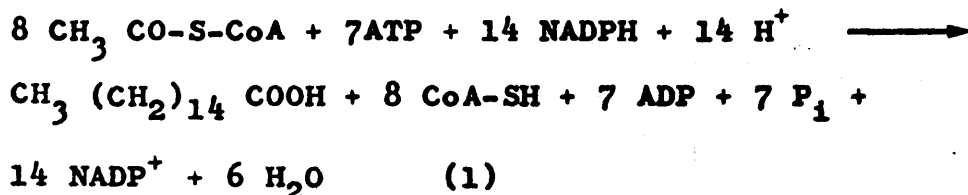
Tanto en hígado como en pulmón existen diferentes mecanismos de biosíntesis de fosfolípidos y no ha sido bien

establecido todavía que tipo de mecanismo predomina en cada órgano. Este tipo de investigaciones reviste particular interés durante el desarrollo fetal ya que el pulmón del feto es un órgano inmaduro hasta prácticamente el término de la gestación, cuando ya es capaz de sintetizar sus tancias -fosfolípidos- que dan al pulmón la estabilidad necesaria así como sus características de actividad superficial.

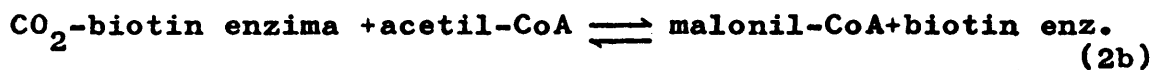
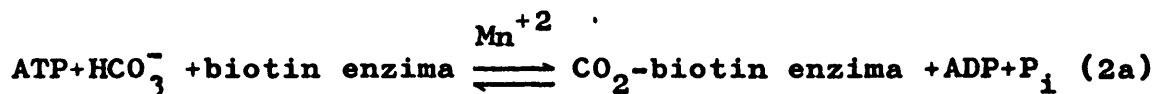
1.2. BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS.

1.2.1. SINTESIS CITOPLASMICA.

La biosíntesis "de novo" de ácidos grasos en la fracción soluble del citoplasma en una gran variedad de sistemas biológicos está catalizada por dos sistemas enzimáticos que actúan de modo secuencial, la acetil-CoA carboxilasa y la ácido graso sintetasa. Todos los átomos de carbono de los ácidos grasos que se biosintetizan por este mecanismo proceden de acetil-CoA. La ecuación (1) expresa la estequimetría total de la síntesis a partir de acetil-CoA del ácido palmítico, el principal ácido graso producido en la mayor parte de los sistemas biosintéticos:



La acetil-CoA carboxilasa cataliza la primera etapa en la síntesis de ácidos grasos a partir de acetil-CoA; es una reacción de carboxilación dependiente de biotina en la que se forma malonil-CoA a partir de acetil-CoA y transcurra en dos pasos (Vagelos, 1.964):

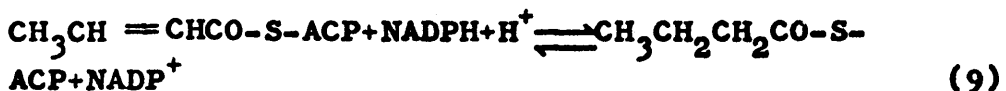
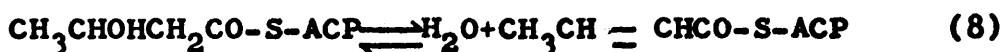
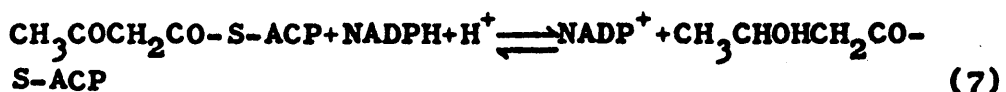
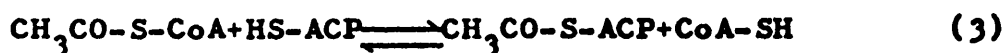


La acetil-CoA carboxilasa ha sido aislada y purificada en una gran variedad de tejidos animales, plantas, levadura y varios microorganismos. En las células animales la enzima se localiza en el citoplasma, aunque se ha sugerido su asociación a microsomas de hígado de paloma (Margolis y Baum, 1.966) y glándula mamaria de conejo lactante (Easter y Dils, 1.968).

La secuencia de reacciones que conducen a la síntesis completa de los ácidos grasos a partir de malonil-CoA es catalizada por el sistema enzimático denominado ácido graso sintetasa, descubierto inicialmente en levadura por Lynen (1.961) bajo la forma de un complejo multienzimático. Posteriormente se han aislado y purificado complejos enzimáticos de diversos tejidos animales, plantas superiores y microorganismos, todos los cuales catalizan reacciones químicas de la misma naturaleza, si bien ofrecen ciertas diferencias en su organización estructural y propiedades moleculares.

La naturaleza y detalle de las reacciones catalizadas por estos complejos enzimáticos ha sido aclarada sobre todo gracias al estudio de sistemas bacterianos en los cuales el sistema enzimático está disociado en sus proteínas individuales, a diferencia de los complejos fuertemente asociados de levadura y animales superiores. Lynen (1.961) propuso que los intermediarios de la biosíntesis de los ácidos grasos están unidos por enlaces tioester a las enzimas constituyentes del complejo, hipótesis corro-

borada por Vagelos y col. (Goldman et al., 1.963; Majerus y Vagelos, 1.964; Majerus et al., 1.965) al aislar del sistema enzimático de *E. coli* una proteína termoestable de bajo peso molecular a la que denominaron "proteína portadora de acilo" (ACP) que es el componente central del complejo y a ella se unen los grupos acilo de los intermediarios a través del resto 4'- fosfopanteteína del ACP formando enlaces tioester. Así se pudo establecer la secuencia de reacciones intermedias de la biosíntesis de ácidos grasos en este microorganismo (Wakil et al., 1.964; Vagelos et al., 1.966):



En la reacción (3) la enzima acetil CoA-ACP transacilase cataliza la transferencia de un resto acetilo desde el grupo SH de la CoA al del ACP, para ser transferido luego (reacción 4) al SH (de un resto cisteína) de la enzima condensante. El resto malonilo es transferido por la malonil-CoA-ACP transacilasa al ACP (reacción 5), teniendo lugar a continuación la reacción de condensación (6); el β -

cetoacil derivado formado experimenta sucesivamente una reducción con NADPH (7), una deshidratación (8) y una segunda reducción con NADPH (9), formandose el correspondiente tioester saturado acil-ACP, el cual puede reaccionar con la enzima condensante para formar el intermediario acil-enzima, liberando el ACP que reacciona con otro resto malonil, iniciando una nueva secuencia de reacciones, en la cual el ácido graso se alarga de nuevo en dos átomos de carbono; y así sucesivamente hasta alcanzar una longitud determinada para la cual se produce la separación de la cadena de ácido graso sintetasa. En *E. coli*, lo mismo que en la mayor parte de los sistemas enzimáticos de animales y plantas, el ácido graso que resulta "in vitro" es ácido palmítico libre, que se separa por acción de una tioesterasa. Ahora bien, el mecanismo de terminación del ácido graso no es general para todos los sistemas. Así, en *E. coli* "in vitro" el palmitil-S-ACP reacciona directamente con glicerol-3-fosfato, por acción de una aciltransferasa específica localizada en la membrana, formando ácido lisofosfatídico, el primer intermediario en la biosíntesis de fosfolípidos (Van den Bosch y Vagelos, 1.970). En levaduras, el ácido graso se transacila con CoA, mientras que en hígado de paloma existe actividad tioesterásica unida a la sintetasa (Phillips et al., 1.970).

1.2.2. SINTESIS MITOCONDRIAL.

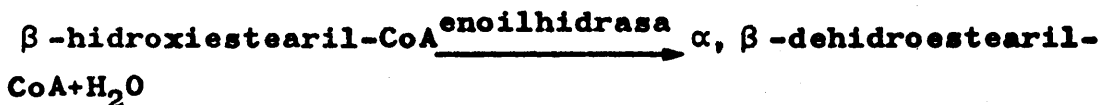
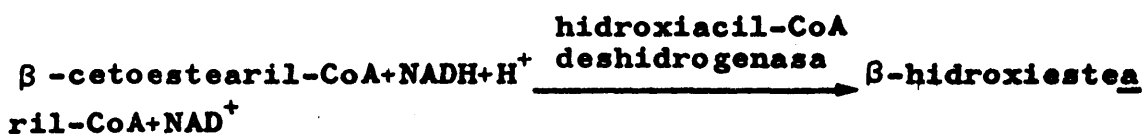
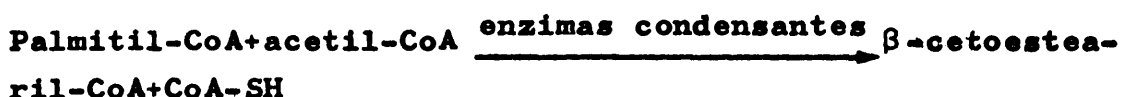
Harlan y Wakil (1.963) han descrito que la síntesis de ácidos grasos en mitocondrias tiene lugar al menos por dos mecanismos. El primero, en el que malonil-CoA actúa como intermediario, es idéntico a la síntesis "de novo" que tiene lugar en el sobrenadante citoplásmico y es también sensible a avidina, al igual que la acetil-CoA carboxilasa. El segundo sistema es un mecanismo de elongación y constituye el clásico mecanismo de síntesis mitocondrial en contraste con el mecanismo de condensación a menudo lla

mado "mecanismo citoplasmático", una parte del cual es ta bién realizable en mitocondrias.

En las mitocondrias, la incorporación de acetil-¹⁴C-CoA en ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados tiene lugar en presencia de ATP, NADH y NADPH. A di ferencia del mecanismo citoplasmático, la presencia de bi carbonato no es esencial para este proceso (Harlan y Walkil, 1.963) porque en el no se utiliza malonil-CoA y por esta razón tampoco influye la avidina.

El mecanismo mitocondrial es una inversión de la β -oxidación, excepto que se requiere NAD para el paso final en lugar de FAD (Langdon, 1.957).

Las ecuaciones para el sistema de elongación pueden escribirse:



Este esquema presupone que la presencia de ambos ti pos de nucleotidos es necesaria para obtener el máximo de síntesis (Walkil, 1.963). Además, la síntesis de ácidos grasos por elongación requiere fosfato de piridoxal.

1.2.3. SINTESIS MICROSOMAL.

Además de los dos mecanismos clásicos de síntesis de ácidos grasos saturados, es decir, por condensación (síntesis citoplásmica) y por elongación (síntesis mitocondrial) se ha postulado un mecanismo de síntesis en microsomas.

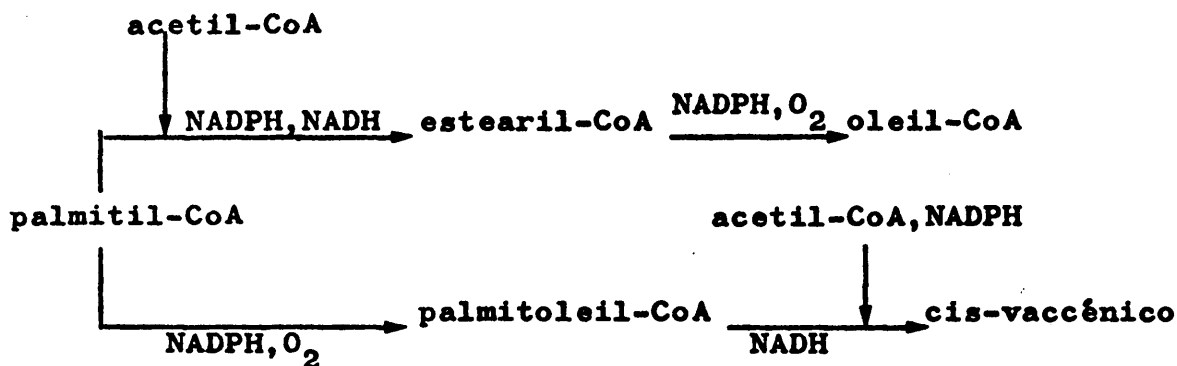
Este mecanismo consiste en una elongación que utiliza malonil-CoA (Christ y Hülsmann, 1.962; Hülsmann y Dow, 1.964; Stoffel y Ach, 1.964; Nugteren, 1.965; Guchhait et al., 1.966). Los equivalentes reductores son aportados por NADPH. La elongación microsomal difiere de la condensación en cuanto a: a) el enoil-CoA producido por deshidratación del β -hidroxiacil-CoA es un compuesto "cis" en el mecanismo de condensación y es "trans" en la síntesis microsomal; b) los compuestos intermedios en el mecanismo de condensación permanecen ligados a proteínas y no son derivados de CoA, mientras que en la síntesis microsomal estos compuestos intermedios se liberan como derivados de CoA; c) en la síntesis microsomal se elongan ácidos grasos de más de 10 átomos de carbono, y d) la elongación microsomal puede tener lugar con los derivados acil-CoA insaturados de 18 carbonos.

Posteriormente se descubrió que en la síntesis "in vivo" de ácidos grasos en hígado, la mayor actividad corresponde a estas partículas microsomales (Favarger y col., 1.969; Rous y Aubry, 1.970).

1.2.4. SINTESIS DE ACIDOS GRASOS INSATURADOS.

Durante mucho tiempo se consideró que los ácidos grasos insaturados eran producto exclusivamente de la desaturación del correspondiente ácido graso saturado. Sin embargo, los trabajos de Bloomfield y Bloch (1.960) y Marsh y James (1.962) han aportado nuevas ideas sobre este problema. Actualmente se sabe que esta reacción de desatu

ración tiene lugar en microsomas (Bloomfield y Bloch, 1.960); Marsh y James, 1.962; Nagai y Bloch, 1.965) y requiere la presencia de NADPH y O_2 molecular (Holloway y Wakil, 1.964). Por otra parte, la reacción de desaturación puede ir acompañada de una reacción de elongación, con lo que el mismo ácido graso saturado puede servir como precursor de ácidos insaturados de diferente longitud de cadena.



Todos los ácidos poliémicos presentes en los mamíferos se forman, por reacciones de elongación y/o desaturación, a partir de cuatro precursores: palmitoleico, oleico, linoleico y linolénico. Sin embargo, los ácidos linoleico y linolénico no pueden ser sintetizados por los mamíferos, quienes tienen que ingerirlos de fuentes vegetales, por lo que son ácidos grasos esenciales.

También ha sido propuesta en mamíferos la síntesis "de novo" de ácido oleico. De hecho, la avidina inhibe la síntesis de ácido esteárico pero no la de oleico en extractos de mitocondrias (Harlan y Wakil, 1.963), por lo que debe excluirse un origen común para estos dos ácidos. Los estudios "in vivo" confirman esta hipótesis (Dupois y Favarger, 1.963; Rajn y Reiser, 1.969).

1.3. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS.

1.3.1. CONTROL DE LAS ENZIMAS DE LA BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS.

Se considera generalmente que la actuación de la acetil-CoA carboxilasa es la etapa limitante de la biosíntesis de ácidos grasos "in vitro", aun cuando si la enzima se ensaya en condiciones óptimas de activación su actividad es similar a la de la ácido graso sintetasa (Majerus et al., 1.968). La acetil CoA carboxilasa está regulada tanto en su actividad como en sus niveles; la actividad enzimática resulta regulada alostéricamente por diversos efectores, de los cuales los ácidos tricarboxílicos y los acil-CoA de cadena larga se pueden considerar como efectores potencialmente importantes desde el punto de vista fisiológico.

La acción activadora ejercida por citrato fue explicada por el descubrimiento de que citrato, isocitrato y otros intermediarios del ciclo de Krebs provocan la polimerización de protómeros inactivos a polímeros activos de la acetil-CoA carboxilasa de tejido adiposo de rata (Martin y Vagelos, 1.962), observación que fue confirmada también en la enzima de otras diversas procedencias. Los análisis cinéticos han demostrado que el efecto más importante de la activación por citrato es sobre la velocidad máxima y no sobre la Km. Por otra parte, los trabajos de los grupos de Lynen y Lane han demostrado que el citrato estimula las dos reacciones parciales (2a y 2b) de la acetil-CoA carboxilasa, por lo que el grupo prostético de la enzima puede considerarse como el locus del cambio conformacional inducido por citrato (Lane et al., 1.970), comprobándose que en la enzima de hígado de ave la polimerización hace que la biotina sea inaccesible a avidina (Moss y Lane, 1.962).

Bortz y Lynen (1.963) han demostrado que concentraciones fisiológicas de acetil-CoA de cadena larga inhiben la actividad de acetil-CoA carboxilasa; esta inhibición es competitiva con respecto a citrato y no competitiva con relación a los sustratos de la reacción, estando además asociada a la despolimerización de la enzima.

El control alostérico de acetil-CoA carboxilasa por palmitil-CoA y citrato permite cambios rápidos en la regulación de la enzima, mientras que los cambios adaptativos en la cantidad de la enzima sirven como modo de regulación a largo plazo, por ejemplo, como consecuencia de efectos dietéticos y hormonales. Así, la actividad de acetil-CoA carboxilasa en hígado está muy disminuida en ratas ayunadas, en ratas alimentadas con una dieta rica en grasa y en ratas a las que se ha provocado diabetes aloxánica. Los estudios inmunoquímicos han demostrado que estos efectos son debidos a una disminución de la cantidad de la enzima. Por otra parte, se ha comprobado que estas alteraciones se deben a modificaciones tanto en la síntesis como en la degradación de la enzima. Así, en estados diabéticos la velocidad de degradación es normal, mientras que la velocidad de síntesis está disminuida (Nakanishi y Numa, 1.970); en los animales sometidos a ayuno, la disminución de la cantidad de enzima se debe a ambos efectos, disminución de la síntesis y aumento de la degradación (Nakanishi y Numa, 1.970; Majerus y Kilburn, 1.969).

En el complejo multienzimático ácido graso sintetasa, los estudios "in vitro" del fenómeno de disociación-reasociación indican la posible influencia que sobre la actividad enzimática "in vivo" pueden ejercer los cambios físicos y químicos en el ambiente celular. Pero además, la regulación de este complejo multienzimático está influenciada por modificadores alostéricos, por condiciones nutritivas, hormonales y de desarrollo, así como por represión

en su síntesis en diversos microorganismos.

La ácido graso sintetasa de diversos orígenes está modulada en su actividad por palmitil-CoA y otros derivados acil-CoA de cadena larga (Robinson et al., 1.963; Lust y Lynen, 1.968). En cuanto al mecanismo de actuación de estos tioesteres, se han dado diversas interpretaciones; Lust y Lynen (1.968) proponen que se trata de un mecanismo de retroinhibición, mientras que Dorsey y Porter (1.968) lo atribuyen a una acción detergente que sería inespecífica.

En relación con la modulación enzimática del complejo ácido graso sintetasa, constituye un hecho importante la estimulación producida por los azucar fosfato entre los que la fructosa-1,6-P es el que presenta efectos más notables (Wakil, et al., 1.966). Estudios cinéticos posteriores han demostrado que la enzima de hígado de pichón es también sensible a inhibición por malonil-CoA, inhibición que es competitiva con relación a NADPH y mixta con relación a acetil-CoA (Plate et al., 1.968).

La ácido graso sintetasa responde en sus niveles a diversas influencias nutritivas y hormonales. Así, la administración a ratas ayunadas de dietas exentas de grasa provoca una marcada elevación de los niveles de ácido graso sintetasa hepática (Allman et al., 1.965). Por el contrario, los ácidos linoleico, linolénico y araquidónico, incluso en muy pequeñas proporciones, hacen descender los niveles de ácido graso sintetasa (Chu et al., 1.969); este efecto es dependiente de la composición de ácidos grasos de la dieta y del órgano estudiado; así, el efecto depresivo originado por ácido linoleico es más acusado en tejido adiposo que en hígado (Egwim y Sgoutas, 1.972). Por otra parte, en hígado de ratas ayunadas o aloxanizadas la concentración de ácido graso sintetasa está disminuida, y recupera los niveles normales por tratamiento con insulina

de los animales diabéticos, efecto que se atribuye a la síntesis adaptativa de la enzima (Burton et al., 1.969).

También se ha estudiado la actividad de ácido graso sintetasa en hígado y cerebro en relación al desarrollo animal (Volpe y Kishimoto, 1.972). La actividad en cerebro es considerablemente mayor en los períodos fetal y lactante que en adulto; la actividad en hígado es baja, excepto una elevación transitoria en el período perinatal, hasta la terminación de la lactancia en que ocurre una rápida y notable elevación.

1.3.2. CONTROL DE LA SINTESIS DE ACIDOS GRASOS EJERCIDO POR LOS NIVELES DE NUCLEOTIDOS REDUCIDOS.

Se acepta generalmente que sólo el NADPH es capaz de aportar el hidrógeno necesario para la biosíntesis de ácidos grasos en el citoplasma (Lynen, 1.961; Ball, 1.966), por lo que la disponibilidad de este nucleotido puede ser decisiva en el control de la síntesis de ácidos grasos. Por otra parte, se creía que el NADPH formado en la ruta oxidativa del fosfogluconato era casi la fuente exclusiva del mismo para la síntesis de ácidos grasos. Pero los trabajos de Flatt y Ball (1.966) y Katz y col. (1.966) demostraron la insuficiencia de esta ruta oxidativa para suministrar los equivalentes reductores necesarios para la biosíntesis de ácidos grasos, incluso en el tejido adiposo, donde la ruta de fosfogluconato es altamente operativa. Se han postulado otras fuentes de NADPH en el citoplasma; de ellas, la procedente de una NADP-isocitrato deshidrogenasa citoplasmática (Lowenstein, 1.961) y la debida a la actividad de la enzima málica (Young et al., 1.964) parecen ser importantes en relación con la biosíntesis de ácidos grasos. Los estudios de Wise y Ball (1.964) y Ballard y Hanson (1.967) sugirieron que esta segunda ruta puede ser operativa, junto con la ruta oxidativa, en el

tejido adiposo para la formación de NADPH necesario para la lipogénesis (Rognstad y Katz, 1.966). Si la síntesis de ácidos grasos es baja, la participación de NADH es relativamente más importante que la de NADPH mientras que si la síntesis de ácidos grasos está estimulada, el NADH proporciona sólo de $1/4$ a $1/2$ del total del hidrógeno necesario para la lipogénesis (Katz y Rognstad, 1.966).

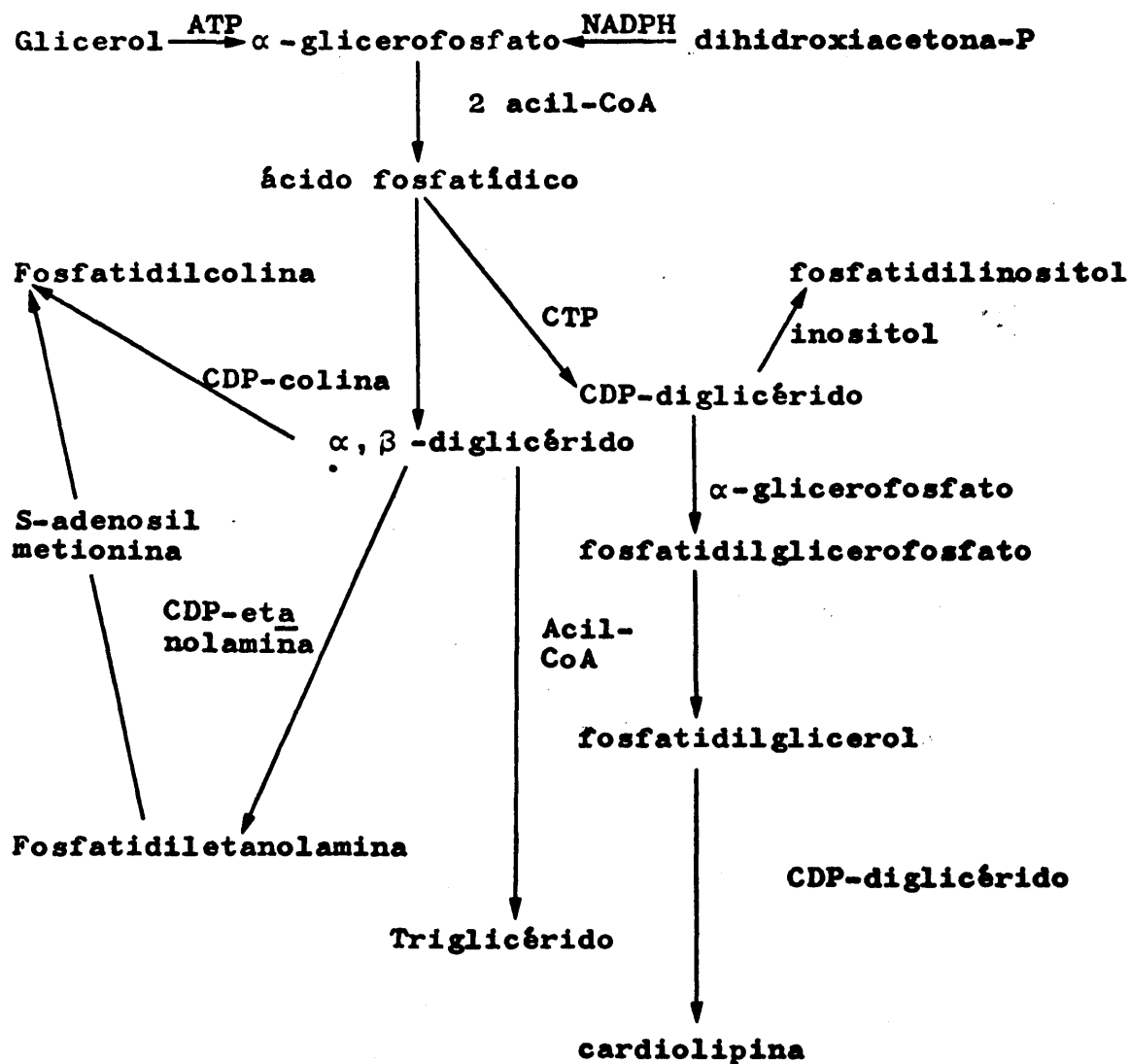
En hígado, las enzimas de la ruta oxidativa poseen una actividad más baja, en comparación con el tejido adiposo (Weber, 1.963) y en consecuencia, las rutas del malato y del isocitrato son todavía más importantes en el aporte del hidrógeno para la lipogénesis.

Así pues, tanto NADH como NADPH ejercen una función importante en el control de la biosíntesis de ácidos grasos. Se ha encontrado que hay más altas cantidades de NADH en los animales en ayunas que en los alimentados (Krebs, 1.967). Se ha sugerido que la relación NADH/NAD controla la actividad de la fosfogliceraldehido deshidrogenasa, de modo que el exceso de NAD estimula la glicolisis. Así pues, la inhibición de la síntesis de ácidos grasos en tejido adiposo de los animales ayunados puede ser debida, entre otras razones, al exceso de nucleótidos reducidos, con lo cual el piruvato sería dirigido hacia la ruta gluconeogénica en vez de transformarse en acetil CoA. Otros resultados apoyan esta hipótesis; así, el acetato estimula la transformación de glucosa en ácidos grasos en el tejido adiposo por disminución de la relación NADH/NAD (Del Boca y Flatt, 1.969). Por otra parte, el lactato es un excelente precursor de ácidos grasos en animales sometidos a dietas ricas en grasas, pero su eficacia en relación a piruvato desciende considerablemente en animales ayunados o alimentados normalmente (Schmidt y Katz, 1.969); sin embargo, la utilización de lactato como precursor de ácidos grasos se facilita considerablemente en presencia de un agente que favorezca el transporte de equivalentes

reductores desde el citoplasma a las mitocondrias (Halperin y Robinson, 1.970).

1.4. BIOSINTESIS DE TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS.

1.4.1. MECANISMO DE BIOSINTESIS "DE NOVO"



Esquema de biosíntesis de Triglicéridos y Fosfolípidos

(Kennedy, 1.961)

La biosíntesis "de novo" de triglicéridos y fosfolípidos (Kennedy, 1.961) tiene lugar mediante una ruta que es en parte común, en la cual el ácido fosfatídico ocupa una posición central.

El mecanismo principal de biosíntesis del glicerol lipídico es a través del α -glicerofosfato (sn-glicerol-3-fosfato) que procede de la fosforilación del glicerol mediante ATP o por reducción de la dihidroxiacetona-P, reacciones ambas que tienen lugar en el citoplasma celular y que constituyen una vinculación directa con la vía degradativa glicolítica. Es muy importante el hecho de que en tejido adiposo la fosforilación de la glicerina constituye un mecanismo cuya importancia cuantitativa en la formación de α -glicerofosfato es prácticamente nula, lo cual fue atribuido por Margolis y Vaughan (1.962) a que este tejido carece de la correspondiente gliceroquinasa que es sin embargo muy activa en hígado. No obstante, Robinson y Newsholme (1.967) han puesto de manifiesto la existencia en tejido adiposo de rata de una actividad enzimática muy baja de gliceroquinasa, hecho que posteriormente ha sido comprobado por otros autores (Korchinsky et al., 1.970).

No obstante, existe otro mecanismo que implica la acilación de dihidroxiacetona-P y posterior reducción con NADPH (Hajra y Agranoff, 1.967; Mannig y Brindley, 1.972). En los estudios realizados "in vitro" por Rognstad y col. (1.974) en células aisladas de hígado de rata han puesto de manifiesto que el papel desempeñado por este mecanismo es de menor importancia desde el punto de vista cuantitativo; sin embargo, queda todavía por demostrar la importancia relativa de esta ruta y la del α -glicerofosfato "in vivo".

Los estudios llevados a cabo sobre localización subcelular y especificidad de sustrato en la acilación del α -

glicerofosfato ponen de manifiesto que en hígado de rata las enzimas acilantes están localizadas en la membrana mitocondrial externa y en el retículo endoplasmático. En mitocondrias de distintos órganos de rata y de hígado de diferentes especies de mamíferos (rata, conejo, bovino, mono, humanos) los sustratos mas efectivos en la acilación del α -glicerofosfato son ácidos grasos saturados, existiendo dos actividades máximas en hígado de rata que dependen de la longitud de la cadena, una para palmítico y otra para láurico (Daae, 1.972 a, 1.972 b, 1.973). El principal producto de la reacción mitocondrial es ácido lisofosfatífidico. En microsomas, los ácidos grasos saturados e insaturados son buenos sustratos para las reacciones de acilación, y el producto principal en la reacción microsomal es ácido fosfatídico (Daae, 197 a, 1.973).

La síntesis "de novo" de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina a partir de ácido fosfatídico puede tener lugar por dos mecanismos distintos, uno a través de diglicérido y el otro a través de CDP-diglicérido. En el esquema adjunto se indica solamente el primero de ellos, ya que en los trabajos más recientes se discute la existencia en animales superiores del segundo mecanismo, que es sin embargo el que predomina en bacterias.

Varios autores (Kano y Sinclair, 1.973 a; Ohno, 1.971; Sundler et al., 1.974) han comprobado en microsomas de hígado de rata la reversibilidad de la reacción catalizada por CDP-colina: 1,2-diacilglicerol colina (y etanolamina) fosfotransferasas que da lugar a la formación de CDP-colina y CDP-etanolamina a partir de los fosfolípidos endógenos. Asimismo Kano y Ohno (1.973 b) han estudiado los 1,2-diglicéridos formados por inversión de dicha reacción a partir de lecitinas endógenas en microsomas de hígado de rata, encontrando que estos 1,2-diglicéridos se degradan por la actividad microsomal; esta preparación celular posee actividad 1,2-diglicérido fosfoquina

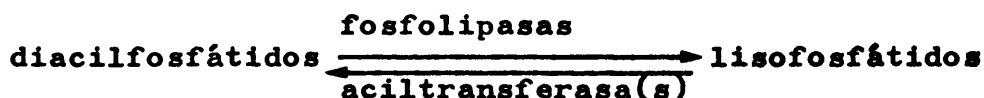
sa que utiliza los 1,2-diglicéridos tanto endógenos como exógenos para formar ácidos fosfatídicos. Además, el análisis de los 1,2-diglicéridos formados indica que la colina fosfotransferasa puede utilizar en su reacción inversa el "pool" total microsomal de lecitinas, pese a su heterogeneidad metabólica y química. Por otra parte, los 1,2-diglicéridos formados a partir de lecitinas son reutilizados para la síntesis de fosfatidiletanolaminas y de triglicéridos.

1.4.2. MECANISMO DE METILACION.

Uno de los mecanismos de biosíntesis de lecitinas cuya existencia está bien establecida experimentalmente es el de la N-metilación de fosfatidiletanolamina por transferencia sucesiva de tres grupos metilo procedentes de S-adenosilmetionina (Gibson et al., 1.961). Sin embargo, recientemente, Salefno y Beeler (1.973), al estudiar la biosíntesis "in vivo" de fosfolípidos y sus precursores en hígado de rata, han encontrado que no sólo fosfatidiletanolamina, sino también etanolamina, fosforiletanolamina y CDP-etanolamina son sustratos para la reacción de metilación, por lo cual proponen debe ser revisada la creencia general de que el único sustrato para la metilación es la molécula completa de fosfatidiletanolamina, idea basada en que en experiencias anteriores realizadas "in vitro" (Gibson et al., 1.961; Bremer y Greenberg, 1.961) no se consiguió detectar la metilación de esos precursores. Estos autores han encontrado también que esta vía de metilación produce preferentemente fracciones más insaturadas de fosfatidilcolina, mientras que la incorporación de colina a fosfatidilcolina en hígado tiene lugar fundamentalmente por fosforilación vía CDP-colina y está favorecida sobre todo en las fracciones más saturadas de lecitina.

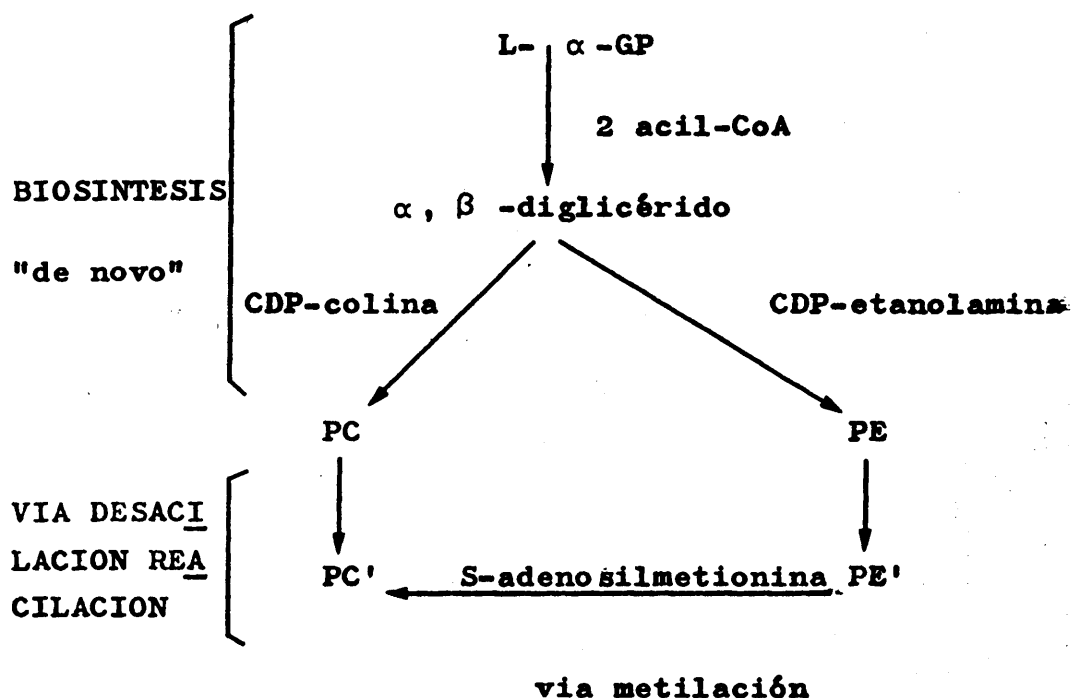
1.4.3. MECANISMO DESACILACION-REACILACION.

La distribución típica de ácidos grasos en fosfolípidos de mamíferos es asimétrica, con predominio de los ácidos grasos saturados en la posición 1, mientras que los ácidos insaturados se localizan predominantemente en la posición 2. Lands (1.965) ha postulado que esta distribución asimétrica de ácidos grasos debe ser el resultado de la actuación de un ciclo fosfolipasa-aciltransferasa:



Este mecanismo fue descrito por primera vez en sobrenadante de hígado de rata por Erbland y Marinetti (1.962) y también fue puesto de manifiesto en sobrenadante de pulmón de rata (Van den Bosch et al., 1.965). Los experimentos llevados a cabo en homogeneizados de hígado y pulmón de rata (Van den Bosch et al., 1.965) y microsomas de hígado de rata (Erbland y Marinetti, 1.965) han demostrado que la incorporación de 1-acil-sn-glicero-3-fosforilcolina a lecitina "in vitro" tiene lugar casi exclusivamente por acilación directa, mientras que el mecanismo de transacilación entre dos monoacil-sn-glicero-3-fosforilcolinas sólo es detectable "in vitro" bajo condiciones de deficiencia energética en el citosol.

En el siguiente esquema se relacionan los diferentes mecanismos de biosíntesis de fosfolípidos estudiados hasta este momento.



1.4.4. MECANISMO DE INTERCAMBIO DE BASES NITROGENADAS.

Durante los últimos años se ha ido acumulando una evidencia cada vez más decisiva de que la colina puede ser incorporada "in vivo" en forma libre a lecitinas de hígado de rata por un mecanismo que no implica la formación de CDP-colina como intermediario (Treble et al., 1.970; Bjerve, 1.971, 1.972). Se ha sugerido que este mecanismo que opera "in vivo" debe ser el mismo que es responsable de la incorporación de colina libre "in vitro" estimulada por Ca^{2+} (DiIs y Hübscher, 1961), el cual ha sido reconocido también en fracciones subcelulares de los cerebros de pollo (Porcellati et al., 1.971) y rata (Kaufer, 1.972), obteniéndose en todos los tejidos estudiados que la máxima actividad de este mecanismo está asociada a la fracción microsomal. Este mecanismo que actúa "in vitro" parece ser común para colina, etanolamina y L-serina y actúa sin requerimiento de energía por lo que se ha supuesto que esta reacción consiste en un intercambio de bases nitrogenadas con fosfolípidos ya preformados. Bjerve (1973a)

ha estudiado la incorporación "in vitro" de bases libres a fosfolípidos de hígado de rata, encontrando que esta incorporación está localizada exclusivamente en la fracción microsomal y que la incorporación de etanolamina tiene lugar preferentemente en las especies poliinsaturadas de fosfatidiletanolamina. Además, este mecanismo de incorporación de bases libres debe ser el sistema principal para la biosíntesis "in vivo" de fosfatidilserina en hígado de rata, mientras que la síntesis "in vivo" de lecitina y fosfatidiletanolamina por este mecanismo es cuantitativamente despreciable, resultado que está de acuerdo con los de otros autores (Salerno y Beeler, 1.973; Sundler, 1.973) según los cuales la incorporación de colina y etanolamina "in vivo" en fosfolípidos de hígado de rata tiene lugar predominantemente por fosforilación via CDP-base, siendo despreciable cuantitativamente el intercambio de bases. En cuanto a los fosfolípidos que participan como sustratos en la reacción de intercambio de bases, Bjerve (1.973 b) ha establecido que en microsomas de hígado de rata pueden actuar como sustratos lecitinas, fosfatidiletanolaminas y fosfatidilserinas, existiendo como única restricción la imposibilidad de que fosfatidiletanolamina se transforme en fosfatidilcolina.

1.5. BIOSÍNTESIS DE ESPECIES MOLECULARES DE FOSFOLÍPIDOS.

Vereyken y col. (1.972) han realizado un estudio comparativo de la biosíntesis de varias especies moleculares de lecitina en pulmón de rata y de lecitina y fosfatidiletanolamina en hígado de rata. En los estudios llevados a cabo "in vivo" mediante inyección de (1(3) - ³H) glicerol, en hígado de rata, 3,5 minutos después de la inyección de este precursor radiactivo se observó que las moléculas de lecitina que contenían ácido linoleico ($\Delta 2$ y $\Delta 3$) po-

seían una actividad específica relativa mucho mayor que las otras especies moleculares de este fosfolípido. Estas observaciones están de acuerdo con los estudios previos realizados "in vitro" por Hill y col (1.968), Van Golde y col (1.969) y Kanoh (1.969) y los estudios "in vivo" de Akesson y col. (1.970 a) que demostraron que el mecanismo que opera predominantemente en la biosíntesis de especies moleculares que contienen ácido linoleico es la síntesis "de novo" via CDP-colina, y, en particular, en las especies palmitoil-linoleil (Akesson, 1.970). Por el contrario, las especies moleculares de lecitina que contienen ácidos tetraenoicos presentan una actividad específica relativa mucho menor, de acuerdo con el concepto de que las especies que contienen ácido araquidónico se sintetizan predominantemente via acilación de monoacil-sn-glicero-3-fosforilcolina.

En el caso de la fosfatidiletanolamina de hígado de rata, la actividad específica relativa más elevada a los 3,5 minutos de la inyección del precursor tritiado correspondió a la fracción hexaenoica, lo que sugiere que en la síntesis de estas moléculas el mecanismo operante principal es la síntesis "de novo" via CDP-etanolamina. A tiempos más prolongados se observa una fuerte disminución de la actividad específica relativa en las especies hexaenoicas, acompañada de un incremento en las actividades de las demás especies de fosfatidiletanolamina, lo que permite sugerir una elevada velocidad de recambio de las especies hexaenoicas. Posiblemente, los 1,2-diacil-sn-glicerol hexaenoicos son convertidos mucho más rápidamente a etanolaminas que las restantes especies de diacilglicerol, como han sugerido Kanoh (1.970) y Akesson y col. (1.970). Por otra parte, otra posible explicación adicional a este hecho es que las especies hexaenoicas, inicialmente sintetizadas por un mecanismo "de novo", pueden ser degradadas rápidamente, posiblemente via fosfolipasa A_2 , que libera el ácido hexaenoico; la fracción restante de 1-acil-sn-

glicero-3-fosforiletanolamina puede ser reacilada con otros ácidos distintos, con el consiguiente incremento de las actividades específicas relativas de las especies moleculares que contengan estos ácidos. En este sentido hay que destacar que la participación de los mecanismos de desacilación-reacilación, particularmente en la formación de especies moleculares tetraenoicas, ha sido sugerida también por Kanoh (1.969) y Akeson y col. (1.970 b).

Los resultados obtenidos en la biosíntesis de lecitinas de pulmón sugieren que la síntesis "de novo" via CDP-colina, cuando se la compara al ciclo desacilación-reacilación, contribuye relativamente más a la formación de lecitinas insaturadas en pulmón que en hígado. Sin embargo, a tiempos largos después de la inyección de glicerol tritiado tiene lugar un descenso considerable en la actividad específica relativa de las lecitinas de pulmón diy trienoicas, a la vez que se observa un incremento continuo de la actividad específica relativa de las especies monoenoicas y sobre todo la dipalmitoil lecitina. Estas observaciones pueden ser explicadas por una menor velocidad de conversión de 1,2-diacil-sn-glicerole monoenoicos y desaturados a lecitinas, o por una contribución importante de los mecanismos de desacilación-reacilación a la formación de lecitinas monoenoicas y desaturadas. Estos resultados obtenidos "in vivo" sugieren que en pulmón, la síntesis "de novo" es el mecanismo predominante en la formación de lecitinas que contienen ácido linoleico y araquidónico y contribuye también significativamente a la síntesis de lecitinas monoenoicas y desaturadas, aunque en la biosíntesis de estas últimas especies parece existir una contribución importante del mecanismo de desacilación-reacilación.

Los estudios llevados a cabo por Lands y Merkl (1.963) y Van den Bosch y col. (1.968) acerca de la acilación de monoacil-sn-glicero-3-fosforilcolinas en hígado de

rata han puesto de manifiesto que las aciltransferasas catalizan predominantemente la unión de ácidos grasos insaturados a la posición 2 de 1-acil-sn-glicero-3-fosforilcolina. Sin embargo, en pulmón, el mecanismo de desacilación racilación juega un papel muy importante en la formación de dipalmitoil lecitina. De acuerdo con estos hechos, Verreyken y col. (1.972) encuentran que las aciltransferasas de hígado de rata catalizan preferentemente la unión de ácidos grasos insaturados a la posición 2 de lecitinas, pero, en contraste con esto, las aciltransferasas de pulmón no catalizan una incorporación preferente de ácidos grasos insaturados a la posición 2, sino que la incorporación de ácido palmítico a esta posición es casi igual a la de oleico y linoleico. Asimismo, las aciltransferasas de pulmón catalizan la unión de cantidades significativas de ácido palmítico a lecitinas de pulmón en perro (Frosolono et al., 1.971), por lo que este mecanismo de acilación de lisolecitina debe desempeñar un papel muy importante en la formación o el mantenimiento de las elevadas cantidades de dipalmitoil lecitina existentes en el pulmón de estas especies, hecho muy importante desde el punto de vista fisiológico por ser la dipalmitoil lecitina el compuesto considerado como principal responsable de la actividad superficial del pulmón que evita el colapso alveolar.

De la discusión anterior se deduce la importancia del mecanismo de acilación directa de lisolecitina en la incorporación de ácido palmítico en la posición 2 de lecitinas de pulmón. Pero además, los trabajos de Akino y col. (1.971) en cortes de pulmón de rata incubados "in vitro", permiten concluir a estos autores que, en este medio de incubación, el mecanismo más importante para la formación de especies moleculares saturadas de lecitina, es el mecanismo de transacilación entre dos especies moleculares de lisolecitina, aunque exista además una contribución de los mecanismos de acilación directa de α -glicerofosfato y de lisolecitina.

Así pues, se puede concluir que la síntesis de dipalmitoil lecitina en pulmón se realiza, al menos parcialmente, por el mecanismo "de novo" via CDP-colina, representando el ciclo desacilación-reacilación un mecanismo adicional en la biosíntesis o en el mantenimiento de este importante compuesto para la actividad pulmonar. Por otra parte, según los trabajos de Björnstad y Bremer (1.966), Spitzer y col. (1.963), Wolfe y col. (1.970) y Di Augustine (1.971), la contribución del mecanismo de metilación de fosfatidiletanolamina a la formación de lecitina de pulmón y especialmente de dipalmitoil lecitina, es muy poco importante.

1.6. INFLUENCIAS EXOGENAS SOBRE LA COMPOSICION Y DISTRIBUCION DE ACIDOS GRASOS EN LIPIDOS.

La composición de ácidos grasos de las diferentes clases de lípidos de plasma y de tejidos se afecta por el tipo de dieta y por influencias hormonales, así como por la administración de diversas sustancias exógenas.

La dieta, y especialmente una dieta rica en grasas, ejerce una influencia notable sobre la composición de ácidos grasos de los lípidos de la sangre y los tejidos, aunque el efecto cuantitativo es diferente según las especies (O- Hea y Leveille, 1.969; Abraham, 1.970; Holman, 1.963; Dryden et al., 1.973). Por otra parte, la alimentación durante un período prolongado con una dieta de bajo contenido de proteínas puede alterar la composición de ácidos grasos de fosfolípidos de hígado de rata (Rogers, 1.972); estos cambios incluyen un descenso en las proporciones de los ácidos esteárico, araquidónico y docosahexaenoico y un incremento en los ácidos oleico y linoleico. Asimismo, la eliminación parcial de proteínas en la dieta puede producir alteraciones en la morfología y composición de ácidos

grasos de mitocondrias de hígado de rata (Harada, 1.967; Rogers, 1.971); las diferencias observadas incluyen un descenso en las proporciones de esteárico y araquidónico y un incremento de los ácidos palmítico, oleico y docosa-pentaenoico.

Noble, Christie y Moore (1.971) han estudiado los cambios en la composición de ácidos grasos de los lípidos del tejido adiposo perirrenal en corderos alimentados con leche materna o con una leche sintética con un bajo contenido en grasas durante los primeros ocho días desde su nacimiento; en el recién nacido, el 18:1 era el ácido graso más abundante en triglicéridos y fosfolípidos, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados estaban presentes exclusivamente en los fosfolípidos; en los animales alimentados con leche materna, durante los ocho días siguientes se observó un aumento considerable del 18:2 y un descenso del 20:3; en los animales alimentados con leche sintética no se produjeron cambios en las concentraciones de estos dos ácidos. Estos autores estudiaron también la distribución posicional de ácidos grasos en los lípidos del tejido adiposo perirrenal, observando que esta variaba según el tipo de dieta recibido por los animales.

La administración a humanos de hormona del crecimento durante un período de tres días provoca un incremento en los porcentajes de palmítico en triglicéridos y de linoleico y eicosatrienoico en fosfolípidos de suero, así como un descenso en el porcentaje de oleico en fosfolípidos (Jurand y Oliver, 1.970).

La administración de ciertas sustancias exógenas es capaz de provocar un cambio en los niveles normales de áci dos grasos y en su distribución en clases de lípidos. Así, el tratamiento con clofibrate de pacientes con hiperlipoproteinemia cambia la composición de ácidos grasos en fosfolípidos (incrementa el porcentaje de ácido nervónico),

en triglicéridos (incrementa el porcentaje de eicosa pentaenoico) y en esteres de colesterol (elevación del porcentaje de ácido linolénico) (Takayasu et al., 1.971).

1.7. METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEINAS PLASMATICAS.

1.7.1. SINTESIS HEPATICA DE LAS LIPOPROTEINAS.

Se considera actualmente que la síntesis de las lipoproteínas comienza cuando su parte proteica ya está formada (Mookerjee, 1.969; Lo y Marsh, 1.970; Bar-On et al., 1.973; Chapman et al., 1.973). Los péptidos de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de elevada densidad (HDL) son sintetizados en los ribosomas de los hepatocitos; los péptidos individuales se liberan de los ribosomas y se unen a un resto hidrocarbonado y a un fosfolípido, atravesando a continuación la membrana endoplásmica. La formación de la unión lípido-proteína tiene lugar en el interior de los sacos endoplásmicos. Después de su migración por el retículo endoplásmico y almacenamiento en el aparato de Golgi, las lipoproteínas son segregadas al medio extracelular por picnocitosis.

El mecanismo de secreción de las lipoproteínas es todavía desconocido. Los trabajos de perfusión del hígado con aminoácidos marcados así como el estudio del destino metabólico de lípidos y apoproteínas individuales (Windmueller y Spaeth, 1.967; Ruderman et al., 1.968; Chapman et al., 1.973; Eisenberg y Rachmilewitz, 1.973) sugieren que sólo las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) son segregadas directamente por el hígado; las otras lipoproteínas se formarían a partir del catabolismo de las VLDL. Las lipoproteínas segregadas por el hígado no tienen todos los esteres de colesterol que se encuentran en las lipoproteínas del plasma, sino que el colesterol se segrega

principalmente como colesterol libre (Barter, 1.974) y su esterificación tiene lugar en el plasma por la acción de la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT).

Parece ser que la disponibilidad en el hígado de ácidos grasos, junto con la presencia de los carbohidratos de reserva apropiados, son factores fundamentales en la regulación de la biosíntesis de las lipoproteínas, aunque se desconoce el mecanismo responsable de este control (Ruderman et al., 1.968; Narayan, 1.970; Baraona y Lieber, 1.970).

1.7.2. SÍNTESIS DE QUILOMICRONES Y VLDL EN LA MUCOSA INTESTINAL.

Los quilomicrones transportan los triglicéridos de la dieta desde los sitios de absorción de lípidos en el intestino delgado, a través del conducto torácico, hasta la sangre y con ella, a los sitios de utilización en los tejidos. Los quilomicrones se forman en la mucosa intestinal como respuesta a la ingestión de ácidos grasos de la dieta de una longitud de cadena a partir de 12 átomos de carbono (Fredrickson et al., 1.967). Estos ácidos son esterificados en la mucosa intestinal a triglicéridos y estos se asocian con los componentes estabilizadores de superficie -colesterol, fosfolípidos, proteínas- formando los quilomicrones (Zilversmit, 1.963). La presencia de la pequeña proporción de proteína que poseen los quilomicrones parece ser esencial para su formación y función. Se ha demostrado la síntesis "de novo" de la proteína de LDL en el intestino (Kessler et al., 1.970) y parece probable que el defecto metabólico causante de la abetalipoproteinemia sea la ausencia de síntesis del componente peptídico de las LDL en el intestino, con lo cual no se sintetizan quilomicrones y los triglicéridos se acumulan en la mucosa intestinal.

Las VLDL transportan los triglicéridos endógenos, y aunque el hígado parece ser el órgano más importante en la síntesis de estas lipoproteínas, se ha demostrado que el intestino también sintetiza VLDL (Windmueller y Levy, 1968; Ockner y Jones, 1970; Windmueller et al., 1973), si bien estas representan solamente un 10% del total de las VLDL del plasma.

El mecanismo de transferencia de los quilomicrones y las VLDL del compartimento intracelular al extracelular es todavía desconocido.

1.7.3. CATABOLISMO DE QUILOMICRONES Y VLDL.

Los quilomicrones y VLDL transportan los triglicéridos en el plasma, tanto los procedentes de la dieta como los sintetizados en el hígado. Los mecanismos y centros de utilización de los triglicéridos plasmáticos han sido objeto de numerosos estudios (Nikkila, 1969; Scow, 1970; Fredrickson y Levy, 1972); se sabe actualmente que los triglicéridos transportados por estas lipoproteínas se transforman en triglicéridos y fosfolípidos en las células de todo el organismo, a excepción del cerebro; la mayor parte de los triglicéridos se dirigen al tejido adiposo y a la musculatura esquelética, y en menor proporción al hígado, bazo, corazón y otros tejidos.

El tejido adiposo capta una parte importante de los triglicéridos circulantes por acción de la lipoproteína lipasa que está presente en la red capilar de este tejido. El diámetro de los quilomicrones y de VLDL es tan grande que no permite su paso a través del endotelio de los capilares del tejido adiposo y los triglicéridos tienen que ser hidrolizados antes de ser captados por el tejido adiposo. Los estudios citoquímicos y de microscopía electrónica

ca han demostrado que la hidrólisis se produce en el interior de las células endoteliales de los capilares (Scow et al., 1.972).

En los demás tejidos extrahepáticos, a excepción del cerebro, la captura de los triglicéridos de VLDL y quilomicrones tiene lugar después de la hidrólisis por una lipoproteína lipasa presente en estos tejidos.

La vida media de los quilomicrones en humanos es de 5 a 15 minutos. Después de la hidrólisis previa de los triglicéridos por la lipoproteína lipasa, los residuos ricos en colesterol y en fosfolípidos son captados por el hígado (Redgrave, 1.970). Los triglicéridos de las VLDL son captados menos rápidamente y la vida media de estas lipoproteínas es de 6 a 12 horas. Su hidrólisis por la lipoproteína lipasa da lugar a LDL y parece ser que todas las LDL del plasma derivan del catabolismo de las VLDL (Langer et al., 1.970). Las concentraciones de VLDL en plasma están determinadas al parecer por un balance entre síntesis y catabolismo; los ácidos grasos libres, los hidratos de carbono y otros precursores de la síntesis hepática de triglicéridos estimulan la producción de VLDL, mientras que insulina, lipoproteína lipasa y concentración absoluta de triglicéridos en sangre parecen ser los factores implicados en su catabolismo.

Los quilomicrones pueden ser también captados por el hígado, aunque actualmente se considera que esta captación directa por los hepatocitos es mucho menos importante de lo que se creía hace algún tiempo. Por el contrario, parece ser que el hígado capta la mayor parte de los ácidos grasos de los quilomicrones después que los triglicéridos de estos han sido hidrolizados. En apoyo de esta idea está el reciente descubrimiento de una triglicérido lipasa hepática (La Rosa et al., 1.972) que se ha demostrado que cataliza la hidrólisis de lipoproteínas ricas en triglicé

ridos (Krauss et al., 1.973; Assmann et al., 1.973).

En las VLDL, el núcleo de triglicéridos está rodeado de una capa de esteres de colesterol, fosfolípidos y proteínas. La captura de estos fosfolípidos en los tejidos tiene lugar por acción de dos enzimas: las fosfolipasas tisulares, PLA_1 y PLA_2 , que se liberan al plasma a la vez que la lipoproteína lipasa después de una inyección de heparina, y, en menor grado, la lecitina-colesterol aciltransferasa, que actúa sobre todo sobre las HDL y que hidroliza el grupo acilo en posición β de la lecitina y lo transfiere al OH en 3 del colesterol.

1.7.4. CATABOLISMO DE HDL Y LDL.

Estas dos familias de lipoproteínas tienen como función fundamental el transporte de colesterol. En humanos, las LDL transportan fundamentalmente colesterol libre desde el hígado a los demás tejidos; las HDL transportarían el colesterol libre desde los tejidos hasta el hígado. En el plasma interviene la lecitina-colesterol aciltransferasa para esterificar el colesterol; esta enzima funciona casi exclusivamente con el colesterol de las HDL, y los esteres de colesterol resultantes de su acción se intercambian e incorporan rápidamente en las otras lipoproteínas (Rothblat, 1.972).

En conejos normales (Chung et al., 1.969), la distribución de colesterol entre las diferentes familias de lipoproteínas plasmáticas es similar a la de humanos normales, aunque sus niveles son menores que en humanos. Por otra parte, durante la absorción intestinal, la mayor parte del colesterol exógeno es transportado por las VLDL en forma de esteres de colesterol (Rudel, et al., 1.973).

1.8. REGULACION DEL METABOLISMO LIPIDICO.

1.8.1. ASPECTOS GENERALES DEL FLUJO DE TRIGLICERIDOS Y SU CONTROL EN MAMIFEROS.

Actualmente parece evidente que los triglicéridos (TG) presentes en el plasma proceden casi exclusivamente de dos únicas fuentes: el intestino y el hígado. En el período posterior a la absorción intestinal, es decir, en ausencia de ingestión de lípidos exógenos, casi todos los triglicéridos circulantes son de origen hepático.

El comportamiento cinético de los triglicéridos del plasma y del hígado, así como el de sus componentes, ácidos grasos y glicerol, es muy complejo, presentando además importantes diferencias según las especies animales, al menos en lo que se refiere a humanos (Farquhar et al., 1.965), conejo (Havel, et al., 1.962), rata (Baker y Schotz, 1.967) y perro (Gross, et al., 1.967).

En la figura 1 se presenta un esquema cinético simplificado de la formación y utilización de triglicéridos plasmáticos y hepáticos en un estado de alimentación normal.

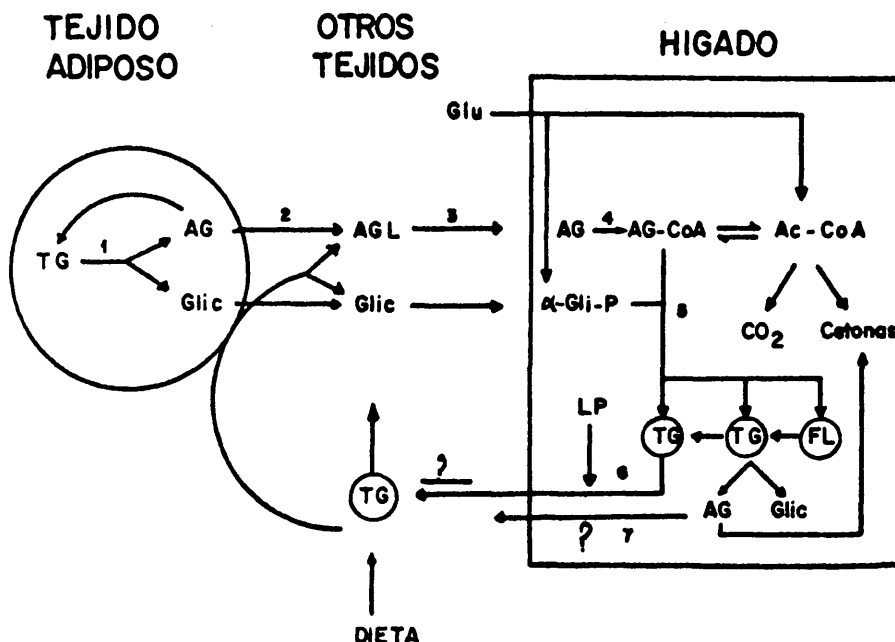


Figura 1

Los ácidos grasos constituyentes de los triglicéridos endógenos presentes en el plasma pueden proceder: (1) de los triglicéridos del tejido adiposo a través de los ácidos grasos libres (AGL) del plasma, (2) de los lípidos de la dieta, (3) de otros lípidos hepáticos, (4) de la síntesis hepática (lipogénesis) y (5) del reciclaje de triglicéridos plasmáticos degradados. La contribución cuantitativa de cada una de estas fuentes al "pool" de triglicéridos plasmáticos y hepáticos depende, entre otras variables, de la especie y del estado de alimentación. Así, en humanos, después de ayunar durante toda la noche, el principal precursor inmediato de los ácidos grasos constituyentes de los triglicéridos del plasma son los ácidos grasos libres (Eaton et al., 1.965); en conejo parece que también un mecanismo análogo a este predomina sobre los demás

(Havel et al., 1.962), mientras que en rata sólo una parte mínima procede directamente de los ácidos grasos libres, siendo la fuente más importante, desde el punto de vista cuantitativo, la lipogénesis hepática y los fosfolípidos (Baker y Schotz, 1.967); hay que destacar que en ratas alimentadas normalmente, la contribución mayor a los ácidos grasos constituyentes de los triglicéridos hepáticos procede de la dieta (Mendenhall, 1.973).

El paso de los ácidos grasos desde los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo hasta glicéridos plasmáticos consta de las siguientes etapas principales:

- 1.- Lipólisis de los triglicéridos del tejido adiposo.
- 2.- Liberación de AGL que pasan a la circulación.
- 3.- Captura por el hígado de los AGL del plasma, que pasan a las membranas mitocondrial y microsomal.
- 4.- Formación de derivados acil-CoA.
- 5.- Esterificación a triglicéridos (glicerofosfato acil transferasa).
- 6.- Unión de los triglicéridos a la apolipoproteína.
- 7.- Secreción al plasma de las lipoproteínas de muy baja densidad y lipoproteínas de baja densidad.

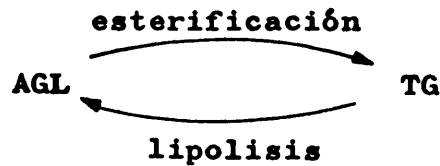
Con toda probabilidad, los puntos más importantes de control de la secreción de triglicéridos hepáticos están localizados en los pasos 2, 5 y 6 del esquema anterior. Por otra parte, la actividad lipogénica del hígado parece ser un factor importante en la liberación de triglicéridos hepáticos (Windmueller y Spaeth, 1.967); además, al perfundir hígado de rata, la secreción de triglicéridos es proporcional a la concentración de ácidos grasos libres en el medio de perfusión (Heimberg et al., 1.969). Estos hechos sugieren que entre las reacciones 2 y 7 no hay etapas li-

mitantes de la velocidad y que los niveles de AGL en plasma deben ser un factor determinante en la liberación de triglicéridos al plasma, al menos en aquellas especies (hombre, conejo) en las que los ácidos grasos libres del plasma son los precursores principales de los ácidos grasos constituyentes de los triglicéridos plasmáticos.

Pero aunque esto sea un factor importante en la regulación de la concentración de triglicéridos plasmáticos, otras reacciones entre las señaladas en el esquema anterior pueden ser también factores determinantes en la secreción de triglicéridos hepáticos. Esto se pone de manifiesto en el estado de ayuno, en el cual los niveles de ácidos grasos libres son elevados pero la secreción de triglicéridos es baja. Aparentemente, la reacción de esterificación (etapa 5) y la síntesis de apolipoproteína (etapa 6) serían pasos clave en esta regulación. De hecho, la esterificación puede estar influenciada no sólo por la actividad de las enzimas, sino también por la velocidad de producción y disponibilidad de α -glicerofosfato (Tzur et al., 1.964). Por otra parte, los resultados de Reaven (1.965) en humanos sugieren que la capacidad para la secreción de triglicéridos hepáticos tiene un máximo, y este límite puede representar la velocidad máxima de síntesis de la apolipoproteína. Esta idea está apoyada por el estudio de Eaton (1.973) que sugiere que la inhibición provocada por glucagón de la síntesis del componente proteínico de las lipoproteínas de muy baja densidad puede contribuir significativamente a la acción hipolipémica de esta hormona.

1.8.2. LIPOLISIS Y SU REGULACION. ESTUDIO DE LOS SISTEMAS ADENIL CICLASA.

Las reacciones clave en el metabolismo lipídico del tejido adiposo son la biosíntesis de triglicéridos y su hidrólisis (lipolisis).



El proceso limitante de la velocidad de hidrólisis de los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo es la hidrólisis del primer enlace ester, etapa catalizada por una lipasa comunmente denominada "lipasa sensible a hormonas" (Vaughan et al., 1.964; Steinberg, 1.967; Schwartz y Jungas, 1.971; Chmelarova y Chmelar, 1.974). Además, el tejido adiposo posee enzimas que hidrolizan diglicéridos y monoglicéridos y cuya actividad es muy elevada; sin embargo, estas lipasas no parecen estar sometidas a control hormonal.

Actualmente se considera que la regulación hormonal de la lipólisis en el tejido adiposo implica la actuación del AMP-c como "segundo mensajero" de la acción hormonal (Huttunen y Steinberg, 1.971; Robison, Butcher y Sutherland, 1.971). En la figura 2 se intenta integrar la información disponible actualmente sobre la regulación de la lipólisis mediada por AMP cíclico.

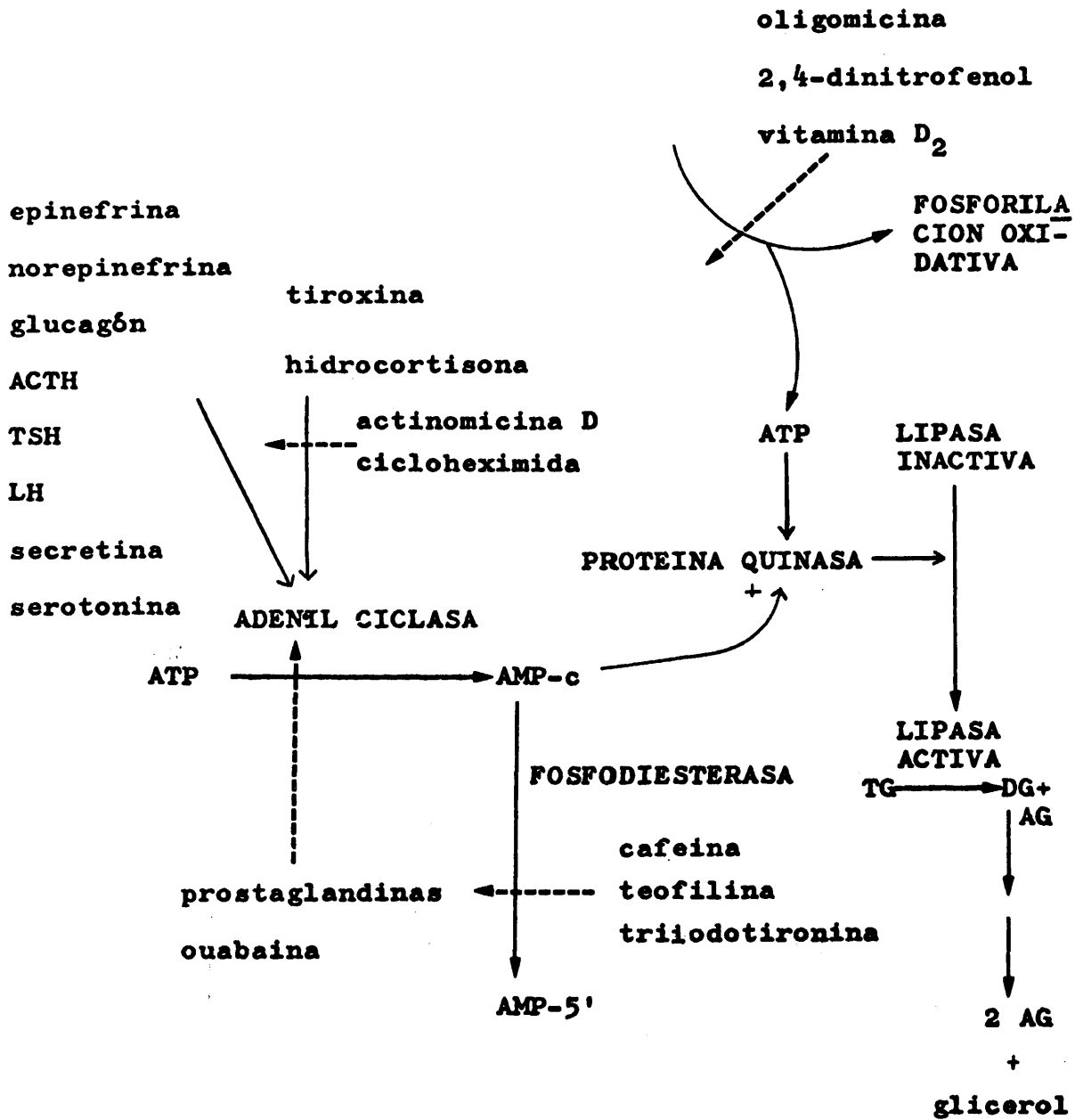


Figura 2.

Los niveles de AMP cíclico están controlados por la actividad adenil ciclasa y la de su fosfodiesterasa específica; esta última se inhibe por metilxantinas, de modo que las acciones fisiológicas de éstas a nivel del tejido adiposo son semejantes a las de las hormonas lipolíticas.

La acción de las hormonas lipolíticas sobre el metabolismo lipídico del tejido adiposo tiene lugar a través de una elevación intracelular de los niveles de AMP cíclico en el adipocito como resultado de la activación de la adenil ciclasa, sistema enzimático asociado a la membrana, al igual que en todos los tipos estudiados de células de animales. Las membranas plasmáticas aisladas de adipocitos poseen un sistema adenil ciclasa que se activa por al menos seis hormonas: ACTH, glucagón, secretina, LH, TSH y catecolaminas (Bär y Hechter, 1.969; Rodbell, Birnbaumer y Pohl, 1.970). Estas hormonas actúan inicialmente en unas localizaciones denominadas "discriminadores" (Rodbell et al., 1.970) que reaccionan selectivamente con la hormona correspondiente y traducen esta reacción en una activación de la adenil ciclasa. Se han propuesto diversos modelos para la estructura y funcionamiento de los sistemas adenil ciclasa (Robison et al., 1.967; Birnbaumer et al., 1.970); en cualquier caso, resulta clara la existencia de dos subunidades, una subunidad receptora (en la que se localizan los discriminadores) que estaría en la parte externa de la membrana, en contacto directo con las hormonas, y una subunidad catalítica, localizada en la superficie interna de la membrana y en contacto con ATP. El modo en que interaccionan ambas subunidades es el principal matiz diferenciador entre los modelos propuestos, pero se considera que en él juegan un papel importante los fosfolípidos de la membrana.

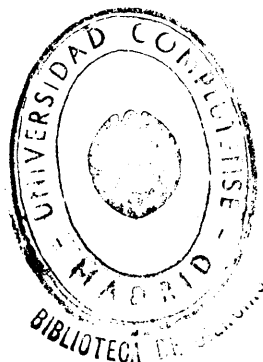
El ion fluoruro estimula un gran número de sistemas adenil ciclasa, pero si bien su modo de acción no es bien conocido, parece ser, sin embargo diferente del mecanismo

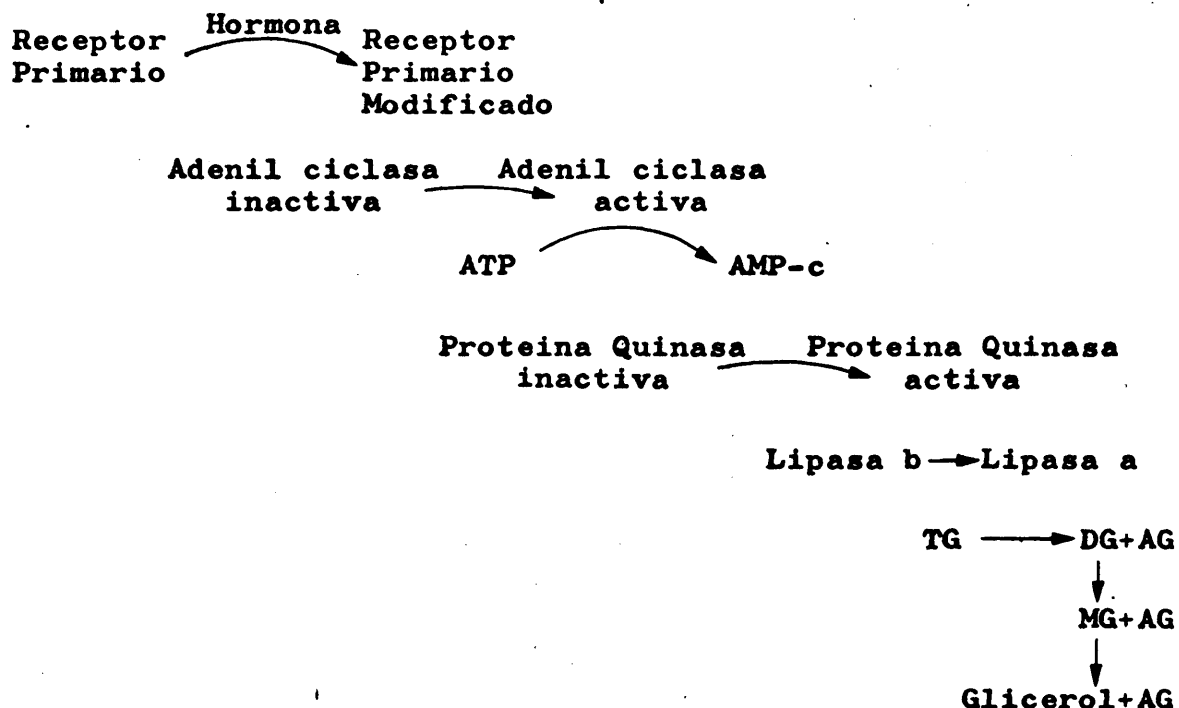
de activación hormonal (Rodbell et al., 1.970). Por otra parte, la activación por fluonro sólo se produce en preparaciones de células rotas que contienen adenil ciclase, pero no incrementa los niveles de AMP cíclico en células intactas (Oye y Sutherland, 1.966).

La lipólisis es una reacción que requiere energía y se inhibe cuando se bloquea la fosforilación oxidativa (Fassina, 1.967). Por otra parte, se ha encontrado que la triglicérido lipasa del tejido adiposo se activa en presencia de AMP cíclico y ATP cuando se añade una proteína quinasa dependiente de AMP-c (Corbin et al., 1.970; Huttunen et al., 1.970). Estos hechos, junto con la identificación de una proteína quinasa dependiente de AMP cíclico en el tejido adiposo (Corbin et al., 1.972) indican que AMP cíclico activa la lipasa a través de una proteína quinasa dependiente de AMP-c: la unión del AMP cíclico a la subunidad reguladora (R) de la proteína quinasa (RC) permite la disociación de la enzima, dejando libre la subunidad catalítica (C) (Brostrom et al., 1.971).



Basandose en estos hechos experimentales, Steinberg y Huttunen (1.972) proponen esta versión de la regulación "en cascada" de la lipólisis:





En cuanto a la insulina, sus acciones sobre la lipolisis no permiten una interpretación inequívoca en cuanto a su modo de actuación. Se sabe que esta hormona ejerce en el tejido adiposo efectos que son contrarios a los producidos por glucagón y epinefrina. El descubrimiento por Butcher y col. (1.968) de que en ciertas condiciones la insulina disminuye los niveles de AMP-cíclico en tejido adiposo y de un efecto análogo sobre los niveles de AMP cíclico en hígado en oposición a glucagón y epinefrina (Exton et al., 1.971), hizo pensar que en este efecto sobre los niveles de AMP cíclico podía estar basada la acción de insulina, pero no se ha conseguido identificar un mecanismo enzimático para este efecto sobre los niveles de AMP cíclico. De hecho, existe una cierta evidencia de que la insulina debe bloquear la activación de la adenil ciclase provocada por hormonas lipolíticas en células adiposas y hepáticas (Hepp, 1.971; Illiano y Cuatrecasas, 1.972). Otra interpretación que se ha considerado para explicar estos hechos es la acción de insulina sobre la actividad fosfodiesterasa. El análisis de los diferentes resultados

obtenidos a este respecto sugiere que al menos algunas de las acciones metabólicas de insulina pueden ser debidas a la activación de una AMP-c fosfodiesterasa presente en las membranas plasmáticas (Appleman et al., 1.973).

Aunque la inhibición de la lipólisis por insulina es un hecho bien establecido, no se trata sin embargo de un efecto invariable. Así, esta inhibición no se observa en presencia de glucosa (Hall y Ball, 1.970), e incluso la actividad lipolítica de catecolaminas se incrementa no tablemente por adición de glucosa e insulina (Angel et al., 1.971; Desai et al., 1.973). Por otra parte, el efecto in hibidor que sobre la lipolólisis estimulada hormonalmente ejerce la insulina se convierte en una activación al in cremenar la concentración de la hormona lipolítica o la de insulina (Desai et al., 1.973; Kono y Barham, 1.973); este efecto antilipolítico y lipolítico de insulina se correlaciona positivamente con cambios en la concentración intracelular de AMP [•] cíclico (Desai et al., 1.973).

La glucosa, con o sin insulina, actua siempre estimulando la lipólisis "in vitro" (Desai et al., 1.973; Knight y Ilife, 1.973), pero no afecta a los niveles de AMP-c en el tejido adiposo (Knight y Ilife, 1.973). Por otra parte, la lipólisis estimulada hormonalmente se inhibe a medida que en el plasma la albúmina se satura con los ácidos grasos liberados por el tejido adiposo, y este efecto va acompañado de un aumento en la cantidad de ácidos grasos (Metz et al., 1.973; Cushman et al., 1.973), por lo que parece que tanto "in vitro" como "in vivo" el grado de saturación de la albúmina en el plasma con ácidos grasos libres es uno de los factores que regulan la movilización de ácidos grasos del tejido adiposo.

1.8.3. ACCIONES DE INSULINA SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO

1.8.3.1. EFECTO. SOBRE LOS NIVELES DE LIPIDOS PLAS- MATICOS.

Uno de los efectos más claros e inmediatos de la administración "in vivo" de insulina es el descenso en los niveles en suero de ácidos grasos libres y glicerol, metabolitos cuyo aporte más importante cuantitativamente procede del tejido adiposo; este efecto, ampliamente documentado, se atribuye fundamentalmente a la acción antilipolítica de la insulina en el tejido adiposo y se ha estudiado ampliamente en la sección anterior.

Existe un número relativamente escaso de datos acerca del efecto de la insulina sobre los niveles de triglicéridos en suero humano no diabético. Jones y Arky (1.965) han descrito que en humanos normales una única inyección de insulina no altera los niveles de triglicéridos en suero, pero una infusión prolongada de la hormona origina un notable descenso de estos niveles. En mujeres, tanto gestantes como no gestantes, se produce un marcado descenso de los triglicéridos en suero 3 horas después de una única inyección intravenosa de insulina (Dannenburg y Burt, 1.965). Asimismo, la inyección de insulina a ratas ayunadas provoca un descenso en la liberación de triglicéridos hepáticos al plasma, efecto que puede ser interpretado como debido a un descenso en el flujo de ácidos grasos procedentes del tejido adiposo hacia la síntesis hepática de triglicéridos para su secreción al plasma (Alcindor et al 1.973).

1.8.3.2. EFECTO. SOBRE LA SINTESIS HEPATICA DE ACI- DOS GRASOS.

Se ha visto anteriormente (1.3.1.) que la lipogénesis hepática está inhibida en ratas sometidas a ayuno y

en ratas a las que se ha provocado diabetes aloxánica, y que esta inhibición es debida a una disminución en los niveles de acetil-CoA carboxilasa (Majerus y Kilburn, 1.969; Nakanishi y Numa, 1.970) y de ácido graso sintetasa (Burton et al., 1.969); estas actividades recuperan sus valores normales por administración de insulina (Burton et al 1.969; Gonçalves et al., 1.972).

Haft, (1.967) ha encontrado que cuando se perfunde hígado de rata con concentraciones fisiológicas de glucosa, la adición de insulina al medio de perfusión incrementa la incorporación de acetato-³H y glucosa-¹⁴C a ácidos grasos totales de hígado. Un resultado análogo ha sido obtenido por Williamson et al., (1.966) en la perfusión de hígado de rata sometida a ayuno.

Un mecanismo probablemente importante en el control de la biosíntesis hepática de ácidos grasos "in vivo" es el ejercido por los ácidos grasos libres y glicerol del plasma y sus metabolitos hepáticos. Por otra parte, las investigaciones llevadas a cabo acerca de la influencia de la insulina sobre la lipogénesis hepática (Sweeney y Ashmore, 1.965; Bewsher et al., 1.966) sugieren que la insulina puede incrementar de forma rápida la síntesis de ácidos grasos en el hígado mediante una acción que es primariamente hepática aunque pueda estar potenciada "in vivo" por otros efectos extrahepáticos de la hormona, por ejemplo, su antilipolisis. Esta acción, cuya localización debe ser ajena a las rutas metabólicas de la glucosa, parece tener lugar a nivel de la propia síntesis de ácidos grasos. En este sentido, son muy significativos los trabajos de Bricker y Levey (1.972) y de Allred y Roehrig (1.973) que ponen de manifiesto que en hígado de rata la lipogénesis hepática a partir de acetato se inhibe por AMP cíclico y su dibutiril derivado, y que esta inhibición tiene lugar a nivel de la acetil-CoA carboxilasa. Esto sugiere que la activación de la lipogénesis hepática por insulina

puede ser mediada por el AMP cíclico.

El efecto a largo plazo del hiperinsulinismo "in vivo" sobre la lipogénesis hepática en animales normales no diabéticos ha recibido relativamente poca atención pese a su indudable importancia. Quizá donde los efectos de un hiperinsulinismo crónico son mejor observados en relación con la lipogénesis es en los animales con obesidad experimental o hereditaria, siendo el más representativo de ellos el ratón con síndrome obeso-hiperglucémico hereditario; en estos animales el metabolismo lipídico es claramente anormal y estas alteraciones pueden considerarse como secundarias a la excesiva e incontrolada secreción de insulina. En estos animales, la síntesis hepática de ácidos grasos a partir de acetato (Winand et al., 1.968), citrato (Howard y Lowenstein, 1.965) y glucosa (Jansen et al., 1.967) está incrementada varias veces con relación a los animales normales y permanece elevada incluso durante el ayuno. Esta estimulación de la lipogénesis hepática es debida a las elevadas actividades de citrato liasa (Kornacker y Lowenstein, 1.964) y acetyl CoA carboxilasa y ácido graso sintetasa (Chang et al., 1.967). También, como es de esperar debido a los elevados niveles de insulina en plasma, la actividad de la glucoquinasa hepática y otras enzimas clave de la glicolisis es también muy superior a la normal (Seidman et al., 1.967).

1.8.3.3. EFECTO SOBRE LA SINTESIS DE TRIGLICERIDOS DE HIGADO Y PLASMA.

Se ha citado anteriormente que el efecto antilipolítico de la insulina debe ser el principal responsable del descenso de los niveles de ácidos grasos libres y glicerol en suero que se produce después de la administración de insulina "in vivo". Aunque algunos autores proponen que esta es la única causa responsable de dicho efecto (West y Passey, 1.967), otros investigadores consideran que existe

además un efecto adicional debido a que la insulina estimula la captura por el hígado de los ácidos grasos libres del plasma (Penhos et al., 1.968).

Como consecuencia de estas acciones extrahepáticas de insulina disminuye la aportación de precursores procedentes del plasma para la síntesis hepática de triglicéridos. Si este efecto no es compensado por un incremento en la lipogénesis hepática y en la formación de α -glicerofofato endógeno, se producirá un descenso en la producción de triglicéridos en el hígado y en su secreción en el plasma en forma de lipoproteínas, aunque la insulina no actúe directamente sobre esta última etapa. Los estudios llevados a cabo en rata (Rubenstein y Rubenstein, 1.966) y en humanos (Csorba et al., 1.966; Nestel, 1.967) sugieren que ninguno de los pasos metabólicos que tienen lugar en la transformación de ácidos grasos libres del plasma en triglicéridos plasmáticos es controlado directamente por insulina, por lo que el descenso de los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres provocado por la acción antilipolítica de la insulina provoca un descenso paralelo en la secreción de triglicéridos hepáticos al plasma.

1.8.3.4. EFECTO SOBRE LA UTILIZACION DE TRIGLICÉRIDOS PLASMATICOS.

Aunque el rápido descenso en los niveles de triglicéridos plasmáticos provocado por insulina puede explicarse por un descenso en la secreción de triglicéridos hepáticos, hay varias indicaciones de que esta hormona influye también sobre los mecanismos de utilización de los triglicéridos, tanto de origen alimenticio como endógeno.

El transporte de triglicéridos desde la sangre al tejido adiposo está íntimamente relacionado con la actividad lipoproteína lipasa de los adipocitos. Cuando el tejido adiposo se incubaba en presencia simultánea de glucosa e in

ulina se produce una activación de la lipoproteína lipasa, probablemente por estimulación de la síntesis "de novo" de la enzima (Salaman y Robinson, 1.966). También se ha comprobado que la administración de insulina "in vivo" provoca un incremento muy rápido de la actividad de lipoproteína lipasa en tejido adiposo de ratas alimentadas y ayunadas (Nikkilä y Pikälistö, 1.968).

En ratas sometidas a ayuno se observa también un incremento en la actividad de lipoproteína lipasa que parece ser debido asimismo a una estimulación de la síntesis de la enzima (Wing y Robinson, 1.968; Patten, 1.970).

Por otra parte, la actividad de lipoproteína lipasa es inhibida "in vitro" por una serie de hormonas (Nestel y Austin, 1.969); de estas hormonas- catecolaminas, ACTH, TSH y glucagón - se sabe además que estimula la lipólisis en el tejido adiposo a través de una elevación de los niveles de AMP cíclico; esto ha sugerido que también la lipoproteína lipasa puede estar regulada en su actividad por AMP cíclico, de forma inversa a la lipasa sensible a hormonas, esto es, la disminución de la concentración de AMP cíclico en el adipocito provocaría la conversión de una forma de lipoproteína lipasa en otra forma más activa (Cunningham y Robinson, 1.969), hipótesis que parece ser apoyada por los estudios posteriores de Stewart y Schotz (1.971) y Garfinkel y Schotz (1.972, 1.973).

El estudio llevado a cabo por Cryer et al., (1.973) parece armonizar ambas ideas sobre la regulación de la lipoproteína lipasa; según estos autores, el aumento progresivo de la actividad lipoproteína lipasa que tiene lugar en la incubación de tejido adiposo de ratas ayunadas se produce en dos etapas, la primera de las cuales no es dependiente de síntesis de proteínas y la segunda sí.

1.9. INFLUENCIA DE LA GESTACION SOBRE EL METABOLISMO DE LIPIDOS.

Se sabe que la gestación produce notables cambios en el metabolismo intermediario; hay cantidad de literatura que se refiere a la llamada "influencia diabetogénica" de la gestación y "prediabetes de embarazo" (Lind et al., 1.973), y sobre otros problemas complejos tanto fisiológicos como clínicos.

Con pocas excepciones, las investigaciones de esta naturaleza se han venido realizando, fundamentalmente, sobre el metabolismo de hidratos de carbono; sin embargo, según los estudios que se están realizando en los últimos años, es presumible que muchas de las citadas alteraciones tengan lugar en el metabolismo lipídico.

1.9.1. MODIFICACIONES CUANTITATIVAS DE LOS LIPIDOS PLASMATICOS.

Se han realizado estudios de este tipo con gran profusión en humanos, desde el primer trimestre de gestación hasta varios días después del parto; analizando los resultados estadísticamente, se han puesto de manifiesto los siguientes hechos: (Mullick et al., 1.964; Cavalli, 1.965; Fairweather, 1.971; Fabran et al., 1.968; Dannenburg et al 1.965; Vikrot, 1.964):

- Una hiperlipemia, que comenzando en el primer trimestre, se incrementa progresivamente y se mantiene hasta 6 días después del parto.
- Un incremento en el nivel de ácidos grasos totales, que comienza en el segundo trimestre y llega a su elevación máxima en los tres últimos meses de gestación, para descender después de 4 días de es

tado puerperal.

- Una hipercolesterolemia (con igual incremento de colesterol libre y esterificado) que manifestando se ya en el primer trimestre, alcanza el máximo al final de la gestación, manteniéndose el nivel en los primeros días del puerperio.
- Un incremento del nivel de cuerpos cetónicos (aceto-acetona, aceto-acético, β -hidroxi butírico), que comienza a ser significativo durante los primeros 6 meses, alcanza un máximo en el tercer trimestre y disminuye rápidamente en los primeros días de estado puerperal.
- Un progresivo incremento de fosfolípidos que comienza en el primer trimestre, sin que tenga lugar una disminución significativa durante los 6 días siguientes al parto. Referente a las clases de fosfolípidos, aumenta, notablemente, la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina a expensas de fosfatidilserina y fosfatidilinositol.
- Incremento de las β -lipoproteínas, desde el segundo trimestre, alcanzándose el máximo en los tres últimos meses; disminuye el nivel durante los 3 días siguientes al parto.

Interpretando estos hechos a la luz de los conocimientos actuales, se puede concluir que durante la gestación se moviliza una gran cantidad de lípidos. El aumento de ácidos grasos no esterificados, glicéridos, fosfolípidos y β -lipoproteínas en plasma, apoya la hipótesis de la existencia de una " hiperlipemia de transporte", inducida por un aumento de lipólisis en el tejido adiposo. Esta interpretación también parece válida para explicar la hipercolesterolemia e hipercetonemia, ya que elevados niveles de ácidos grasos no esterificados en plasma incrementan la oxidación periférica de los ácidos grasos y, por tanto, la formación de acetyl-CoA. Considerando que este metabolito es un precursor del colesterol y de los

cuerpos cetónicos, y que su entrada en el ciclo de Krebs está reducida durante la gestación (debido a la baja utilización de glucosa), se comprende que elevados niveles de ácidos grasos libres conduzcan a la biosíntesis de ambos metabolitos.

Si bien estos fenómenos de hiperlipemia plasmática gestacional tienen lugar en la mayoría de las especies, ocurre exactamente lo contrario en el caso del conejo y del cobaya (Popjak, 1.946); ambas especies desarrollan una profunda hipolipemia, referente a casi todas las clases de lípidos plasmáticos, hacia el final de la gestación. Esta enorme disminución en el contenido de lípidos plasmáticos fue atribuida por Baumann y Holly (1.925-26) a una utilización rápida de los lípidos maternos por el feto, durante el período de su máximo crecimiento; sin embargo, el grado de hipolipemia es independiente del número de fetos que contiene la madre, por lo que la anterior hipótesis no resulta satisfactoria. Probablemente deba de ser atribuida a determinadas influencias hormonales que se desarrollan durante la gestación (Popjak, 1.954).

En mono rhesus se presenta una hipolipemia, con un aumento de ácidos grasos y triglicéridos, sólo al final de la gestación (Roux et al., 1.974).

1.9.2. INFLUENCIAS HORMONALES.

Debido a que la gestación produce una hiperlipemia de transporte, así como un considerable incremento de la lipólisis, se realizaron numerosos experimentos con el motivo de dilucidar los mecanismos que producen dichos efectos. Con este fin se estudiaron las modificaciones de la glucemia y ácidos grasos libres de plasma, después de la administración de glucosa, insulina, glucosa más insulina, fructosa, fructosa 1-6P, epinefrina y norepinefrina

a mujeres gestantes, a partir del tercer trimestre de gestación, así como a mujeres controles llegandose a los siguientes resultados: (Froesch et al., 1.962; Froesch, 1965; Grinsberg, 1.965; Lind et al., 1.973).

La glucosa, insulina y glucosa más insulina conducen a una reducción de los ácidos grasos libres de plasma, observandose que esta disminución era significativamente menor en las mujeres gestantes que en las controles; los mismos resultados se obtuvieron con fructosa. La fructosa 1-6 P, que en los sujetos control reduce el nivel de ácidos grasos libres del plasma, no tuvo ningún efecto sobre los niveles de glucosa y ácidos grasos libres del plasma de mujeres gestantes. Esto pone de manifiesto que en condiciones de disponibilidad de glucosa, la lipólisis disminuye menos en las mujeres gestantes, hechos que pueden ser explicados de dos maneras diferentes: que el tejido adiposo de las mujeres gestantes utilice glucosa en cantidad inferior que las controles debido a una menor sensibilidad a los efectos de la insulina, o bien, que las células adiposas reaccionen normalmente a la insulina y metabolicen la glucosa cuantitativamente de forma normal, pero que lo hagan por una vía metabólica diferente de la normal. En favor de la segunda hipótesis está el hecho de que ~~en~~ mujeres gestantes, la disminución de ácidos grasos libres de plasma es menor que en estado normal, incluso después de la administración de fructosa, que es una hexosa cuya utilización es sólo parcialmente dependiente de la insulina. En otras palabras, puesto que el metabolismo de la fructosa puede transcurrir independiente de la insulina, el tejido adiposo de ambos tipos de mujeres debería utilizarla casi en igual medida; el hecho de una menor esterificación de los ácidos grasos libres en mujeres gestantes hace suponer la existencia de una distribución diferente de la hexosa en las diferentes rutas metabólicas, lo que supone la síntesis de cantidades menores de glicerofosfato activo.

Excluyendo, entonces, el hecho de que los elevados niveles de ácidos grasos en plasma sea debido a una reducción en la utilización de glucosa por las células adiposas, las investigaciones de dirigieron a establecer si la diferencia en la reesterificación de los ácidos grasos libres se debía a una hipersensibilidad del tejido adiposo a conocidos agentes lipolíticos.

Evaluando los efectos de infusiones intravenosas de epinefrina y nor-epinefrina sobre los niveles de glucosa y ácidos grasos libres de plasma, se observó que ambas hormonas incrementan el nivel de dichos ácidos grasos, sensiblemente en mayor proporción en mujeres gestantes que en controles. Con respecto a la epinefrina, este fenómeno podrá ser debido a una hipersensibilidad de las lipasas del tejido adiposo a la estimulación por catecolaminas, o bien, a que en estado de gestación la adrenalina produzca una menor hiperglucemia que en estado normal, con la consiguiente disminución en la reesterificación de los ácidos grasos. Esta última posibilidad se puede excluir sobre la base de las experiencias con nor-adrenalina, que ponen de manifiesto que incluso utilizando una hormona sin apenas actividad glucogenolítica, el resultado obtenido es el mismo.

Asociadas con estas alteraciones en el metabolismo lipídico, existen a su vez, cambios en el metabolismo de la glucosa, durante la gestación, que consisten, principalmente, en una reducción de la tolerancia por la glucosa, así como una resistencia a los efectos de la insulina, (Bleicher, 1.964; Benjamin, 1.960; Velasco, 1.966; Lind, 1.973). Estudios realizados por Knopp et al., (1.973) en tejido adiposo de rata gestante ponen de manifiesto que la hiperfagia y el hiperinsulinismo maternos son característicos de la segunda mitad de la gestación; dentro de este período se han identificado dos fases metabólicas distintas. Inicialmente la acumulación de grasa se ve aumentada por una conversión de glucosa a ácidos grasos de

triglicéridos y una disminución de la liberación de ácidos grasos; las necesidades fetales y placentales son mímas en este período. Posteriormente, hasta el final de la gestación, la efectividad de la insulina se deteriora progresivamente y la formación de ácidos grasos de triglicéridos a partir de glucosa se reduce considerablemente, movilizándose los depósitos de grasa materna de forma creciente, como ácidos grasos libres. Estos hechos están estrechamente sincronizados con el crecimiento de la unidad feto placental. Estos resultados indican que el almacenamiento de grasa materna resulta estimulado por un incremento en la toma de alimento y de insulina plasmática en la mitad de la gestación. Sin embargo, pese a la continua hiperfagia e hiperinsulinismo hasta el final de la gestación, el depósito de grasa en la madre disminuye como consecuencia de un descenso en la respuesta del tejido adiposo a la insulina; este mecanismo puede considerarse como una adaptación para el crecimiento fetal de modo que la glucosa ingerida es derivada hacia el metabolismo del feto. Al mismo tiempo, los lípidos almacenados previamente son movilizados para proporcionar a la madre una fuente de energía en sustitución de la glucosa.

Existe una gran cantidad de estudios referentes a la regulación hormonal del metabolismo lipídico, de los que se puede establecer que, en un organismo normal, los factores lipolíticos: STH, tiroxina, glucagón, cortisona, catecolaminas y estrógenos, son opuestos al efecto antilipolítico de la insulina; y es sabido, también, que el sistema nervioso simpático ejerce una continua y extensa estimulación de los glicéridos en el tejido adiposo.

Con estas referencias se han estudiado las alteraciones del sistema endocrino durante la gestación y se puede decir, en líneas generales, que junto a una clara hipersecreción de estrógenos, progesterona y un gonadotropismo crónico, existe durante la gestación un incremento de

alguno de los factores endocrinos que tienen actividad lipolítica:

La mayoría de los autores admiten la existencia de una hipersecreción de STH (Gemzell et al., 1.955; Laron et al., 1.967) y del tiroides (Barnes, 1.965), así como un incremento significativo de cortisona (Martin et al., 1.968; Bro-Rasmussen et al., 1.962; Fairweather, 1.971); sin embargo, análogamente a lo que ocurre después de un tratamiento con estrógeno, ciertos investigadores mantienen que, durante la gestación, únicamente se incrementa el cortisol unido a la transcortina, y por tanto no existe una verdadera hipersecreción de corticoides. Este problema no ha sido del todo resuelto todavía, debido a que las evaluaciones de la velocidad de secreción de cortisona con métodos radioscópicos y las determinaciones individuales de cortisol en plasma, demostraron que la corteza adrenal segrega una gran cantidad de hidrocortisona y el cortisol libre alcanza niveles más elevados que en estado normal (Doe et al., 1.960; Gantray, 1.968; Fairweather, 1.971).

Con respecto al comportamiento de la médula adrenal, los datos obtenidos de la literatura son contradictorios. El nivel en plasma de las dos catecolaminas es normal para algunos autores (Israel et al., 1.959) y se eleva para otros (Leone et al., 1.958).

Spoto, (1.962) hace un extenso examen de la literatura, poniendo de manifiesto que no existen pruebas seguras del hecho de que, a lo largo de la gestación, se produzca una hiperactividad del sistema nervioso simpático. No obstante, parece que la gestación modifica, de diferentes formas, el equilibrio neuro-vegetativo de varios órganos, por lo que no se puede excluir la posibilidad de un hipertono simpático en torno al tejido adiposo.

Se puede concluir, por tanto, que incluso sin consi

derar los factores intrínsecos de la célula adiposa, la lipólisis se puede explicar mediante las modificaciones del sistema endocrino, que tienen lugar durante la gestación.

Se ha visto a partir de los estudios realizados en los últimos años que las modificaciones del metabolismo de lípidos dependen, en gran parte, de la actividad de la placenta. Josimovich (1.962) aisló, de la placenta humana, una proteína con propiedades semejantes a las de la prolactina y a la STH, que denominó "Lactógeno placentar humano" (HPL). Dos años más tarde Kaplan (1.964) aisló de la placenta la "Hormona de crecimiento - prolactina coriónica" (CGP), una proteína placentar análoga, que alcanza el máximo de concentración en la sangre materna en los tres últimos meses de gestación. La placenta segrega también una nueva hormona, la gonadotropina coriónica, así como una gran cantidad de estrógenos y progesterona, pudiéndose concluir que este órgano contribuye también a potenciar los efectos lipolíticos y antiinsulínicos de la gestación. Knopp et al. (1.973) en sus experiencias sobre tejido adiposo de rata, ponen de manifiesto que, en la segunda parte de la gestación, se libera somatotropina coriónica, provocándose una acción antagónica a la insulina que trae como consecuencia un aumento en la movilización de ácidos grasos así como una disminución en el consumo de glucosa, que a su vez es utilizada por el feto.

En tal situación endocrina, la actividad funcional de los islotes de Langerhans no puede dejar de verse afectada, y sería presumible que la gestación produjese un hiperinsulinismo secundario, y de hecho se observó que, durante la gestación, los islotes poseen una actividad basal más elevada (Quinto et al., 1.964). Realizando investigaciones histológicas en humanos y otras especies, se observó la existencia de una hiperplasia e hipertrofia de los islotes, con un aumento significativo de la insulina

del plasma. Utilizando métodos radioinmunológicos, muchos autores observaron que, después de una administración de glucosa, el nivel de insulina se eleva más en mujeres gestantes que en normales (Lind et al., 1.973; Picard, 1.967). De acuerdo con estos y otros autores (Freinkel, 1.964), se puede explicar este fenómeno como un "turnover" mucho más rápido de la insulina, relacionado con una degradación de la hormona por las enzimas proteolíticas ("insulinasa").

Todas las modificaciones metabólicas de la gestación se pueden explicar aceptando la teoría de Randle sobre la función del ciclo "glucosa-ácidos grasos". De acuerdo con esta teoría, basada en numerosos hechos clínicos y experimentales (Randle et al., 1.965; 1.966), el equilibrio entre estas dos sustancias, fundamentalmente energéticas, podría ser el resultado de un mecanismo de autorregulación mediante el cual, mientras que por un lado la utilización de glucosa inhibe la lipólisis y la oxidación de los ácidos grasos libres en el músculo, por otro, la movilización y utilización periférica de los ácidos grasos, reduce el metabolismo de la glucosa a nivel de dicho órgano y, al menos en estados diabéticos, también a nivel de la célula adiposa.

Este ciclo constituye un sistema homeostático que, a parte de cualquier influencia endocrina, mantiene el nivel de glucosa constante. De acuerdo con este autor, la utilización de glucosa por el músculo no se inhibe únicamente por los ácidos grasos libres sino también por los cuerpos cetónicos que, como es sabido, se originan en el hígado, principalmente a partir de ácidos grasos. Experimentos realizados en corazón de rata, tanto "in vitro" como aislado y perfundido, demuestran que la adición de ácidos grasos y de cuerpos cetónicos, reduce, incluso en presencia de insulina, el consumo de glucosa (inhibiciones de la hexoquinasa, fosfofructoquinasa y pirúvico deshidrogenasa).

Aunque, como se expuso más arriba, este ciclo asegura una homeostasis sin necesidad de una intervención del sistema endocrino, algunas hormonas pueden afectar su función. La insulina reduce la lipólisis en el tejido adiposo y en músculo, con aumento de la esterificación de los ácidos grasos mientras que las hormonas antiinsulínicas actúan en el ciclo estimulando la lipólisis. De acuerdo con la teoría de Randle, el efecto inhibitorio de estas hormonas sobre la utilización periférica de glucosa, no sería un fenómeno debido a una interferencia con los sistemas enzimáticos musculares, sino a una simple consecuencia de sus propiedades "lipomovilizantes". Si se acepta esta teoría, las relaciones entre las modificaciones de los metabolismos de glucosa y lípidos, durante la gestación, deberán interpretarse de diferente manera. En efecto, los cambios en el metabolismo de la glucosa estarán subordinados a las del lipídico, como se pone de manifiesto por los siguientes hechos: aumento de hormonas lipolíticas, incremento de la sensibilidad de las lipasas a las catecolaminas, aparición de un factor lipolítico placentario, incremento consiguiente de la movilización de ácidos grasos libres de los depósitos de grasa, con un aumento de la concentración de los mismos en plasma que interfiere con la utilización periférica de glucosa, determinando una resistencia a los efectos glicolíticos de la insulina y causa, por lo tanto, un hiperinsulinismo secundario.

1.9.3. BIOSINTESIS DE LIPIDOS.

El elevado nivel de lipólisis durante la gestación, puede parecer contradictorio con el hecho de que normalmente se incrementan las reservas de grasa durante dicho estado, no solamente en casos de exceso de dieta sino en casos de una dieta normal. Es necesario admitir, entonces, que durante la gestación las células adiposas sintetizan ácidos grasos en mayor proporción que en estado normal.

Este fenómeno sólo puede ser explicado parcialmente por el hiperinsulinismo gestacional, ya que la insulina ejerce, al mismo tiempo, efectos lipogénicos y antilipolíticos. El problema consiste, entonces, en clasificar los mecanismos a través de los cuales, en presencia de altos niveles de insulina, el tejido adiposo de una mujer gestante incrementa su actividad lipogénica sin una disminución de la lipólisis. Se sabe que las células adiposas utilizan la glucosa mediante la ruta de Embden - Meyerhof y la ruta de las pentosas; ambas vías metabólicas conducen a la formación de dos triosas-P: gliceraldehído-P y dihidroxiacetona-P. Existe entre ambas un equilibrio que depende de la actividad de la triosa-P-isomerasa y de las velocidades de las reacciones siguientes a cada una de ellas. La contribución de ambas rutas en la utilización de glucosa se estudia incubando células adiposas con glucosa marcada radiactivamente en posiciones 1 y 6 respectivamente, habiéndose llegado a los siguientes resultados: (Martin et al., 1.965; Katz et al., 1.966):

- En tejido adiposo de una mujer gestante predomina el ciclo de las pentosas sobre la ruta de Embden-Meyerhof.
- En sentido absoluto, el tejido adiposo sintetiza, a partir de ambos precursores, cantidades de ácidos grasos y glicerol superiores a las normales.
- La síntesis de ácidos grasos es relativamente superior a la de glicerol.
- Con respecto a mujeres control, la cantidad de glucosa metabolizada via pentosas es mayor en las mujeres gestantes, si se calcula sobre la base de síntesis de glicerol.
- La conversión de gliceraldehído-P a dihidroxiacetona-P es mucho menor que en estado normal, en las células adiposas.

Estos hechos ponen de manifiesto que existe un aumen

to de la lipogénesis durante la gestación; las células adiposas sintetizan más ácidos grasos y menos glicerol a partir de glucosa, explicando razonablemente bien el mecanismo mediante el cual el tejido adiposo de una mujer gestante puede, al mismo tiempo, incrementar sus actividades lipolíticas y lipogénicas. En efecto, si las cantidades mayores de glucosa que se utilizan por el tejido adiposo (bajo el estímulo de la insulina) se transforman en ácidos grasos más que en glicerol, es lógico que junto a un incremento de la lipogénesis haya una falta relativa de α -glicero-P, responsable de una mayor movilización de ácidos grasos, y el alto contenido en glicéridos de la célula adiposa podría explicar la hipresensibilidad de las lipasas a las catecolaminas.

El hígado juega un papel muy importante en el metabolismo intermediario, experimentando una serie de alteraciones durante la gestación: (Dannenburg et al., 1.964)

- La lipogénesis hepática, a partir de acetato, es superior en estado gestante que en normal.
- Cuando se utilizan pirúvico y glucosa como precursores, la actividad liposintética es igual en estado normal y gestante.
- No hay diferencias cualitativas en la utilización hepática de glucosa, que se puede detectar comparando radiactividades incorporadas en glicerol y en ácidos grasos.

Estos resultados, si bien son ciertos para la mayoría de las especies estudiadas, resultan contradictorios cuando se estudia la lipogénesis en tejidos de conejo o cobaya gestantes (Popjak, 1.964; Roux, 1.966). El estudio sobre la utilización de acetato por cortes de hígado de conejos gestantes y no gestantes proporciona una explicación para la hipolipemia gestacional; los cortes de hígado

do de coneja gestante utilizaron mucho menos acetato que las no gestantes; la lipogénesis reprimida en el hígado es atribuible a alguna influencia hormonal. Asimismo, Popjak y Beckmans (1.950) encontraron que la velocidad de síntesis de colesterol es inferior en conejas gestantes.

1.9.4. ACIDOS GRASOS DE PLASMA Y TEJIDO ADIPOSEO

El término "lípidos" incluye toda una serie de sustancias diferentes en su composición química y propiedades, pero que tienen un elemento estructural común, el ácido graso.

Mediante análisis por cromatografía de gases, se ha puesto de manifiesto que, en plasma de mujeres gestantes se produce, en las diferentes fracciones lipídicas, un aumento progresivo en el porcentaje de ácidos grasos saturados (sobre todo palmítico) y una correspondiente disminución de los poliinsaturados (sobre todo linoleico y araquidónico), excepto en los fosfolípidos, en los que se eleva el porcentaje de linoleico y el de araquidónico permanece invariable.

En cuanto al tejido adiposo, no se aprecian variaciones significativas durante la gestación.

En ratas se ha visto que la gestación determina, tanto en plasma como en tejidos, modificaciones similares a las observadas en humanos; sin embargo, en tejido adiposo hay una disminución significativa de linoleico. (Bergher et al., 1.964; Leake et al., 1.964; Mc. Kay et al., 1.963; Degrelle-Cheymol, 1.970).

En cuanto a las influencias hormonales, los estrógenos actúan sobre el metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados, incrementando la esterificación, en fosfo

lípidos, del ácido araquidónico y favoreciendo la movilización de ácido linoleico de los depósitos. Los elevados niveles de estrógenos en plasma podrían explicar por qué en los fosfolípidos de plasma de humanos gestantes no tiene lugar una disminución de poliinsaturados. Considerando, además, las relaciones metabólicas entre los fosfolípidos y los esteres de colesterol (el colesterol recibe una gran parte de sus ácidos grasos poliinsaturados de ciertos fosfolípidos, mediante un proceso de transesterificación), la reducida concentración de ácido araquidónico en los esteres de colesterol de mujer gestante depende de una insuficiencia en el proceso de transesterificación, relacionada con la hipercolesterolemia gestacional.

El incremento de ácidos grasos saturados y la disminución de insaturados puede deberse a los siguientes hechos:

- El tejido adiposo contiene preferentemente ácidos grasos saturados; el aumento de la lipólisis produce un aumento de estos en el plasma.
- La mayor utilización de ácidos grasos libres por los tejidos maternos, quienes oxidan, preferentemente, los insaturados.
- Considerable absorción de ácidos poliinsaturados (sobre todo de los esenciales) por el feto y placenta.

1.10. PERMEABILIDAD DE LA PLACENTA. ORIGEN DE LOS LÍPIDOS FETALES.

Según el concepto ya tradicional de Mossman (1.937), se puede decir que la formación de la placenta consiste en la aposición íntima de los órganos fetales con los tejidos maternos, con el fin de facilitar los intercambios fisió-

lógicos que han de tener lugar entre la madre y el embrión en desarrollo. En la placenta normal, al final del embarazo, puede apreciarse una parte de origen fetal (corión) y una parte materna, resultado de la transformación de la mucosa uterina (decidua basal).

La placenta es un órgano metabólicamente activo; desde el punto de vista funcional es algo más que una membrana semipermeable. Hoy sabemos que está formada por tejidos de gran actividad metabólica, y se han encontrado en ella potentes sistemas enzimáticos (Edlow et al., 1.971; Karp W. et al., 1.971; Karp, 1.971). El paso activo de sustancias nutritivas de la madre al feto requiere la intervención de enzimas que catalicen este sistema de transporte. Además es necesario también un mecanismo metabólico capaz de suministrar la energía necesaria para que estos procesos se lleven a cabo. Esta energía viene proporcionada en forma de ATP y se origina en las células, a través de los procesos normales.

Podemos considerar, además, a la placenta como reguladora del metabolismo fetal; este órgano tiene gran cantidad de glucógeno y un sistema enzimático capaz de transformarlo en glucosa durante la primera parte de la gestación (Demers et al., 1.973; Gabbe, 1.972); pero la reserva de glucógeno y la actividad enzimática disminuyen a medida que avanza la gestación, de tal forma que no se encuentra esta enzima en placentas recogidas a término. Ya Claude Bernard, 1.871 había atribuido a la placenta el papel de "hígado transitorio", considerando la glucosa como un importante depósito gluco-regulador, que va evolucionando a medida de que el feto va adquiriendo autonomía metabólica. Estudios recientes de Cedard, (1.970), sugieren que el contenido de glucógeno en placenta a término puede ser el factor limitante en el aporte de energía para la aromatización en la biosíntesis de estrógenos. La gonadotropina coriónica puede iniciar este proceso, a través de la

activación del sistema adenil-ciclasa, con la consiguiente glucogenolisis (Ferre et al., 1.972). Un estado diabético, natural o inducido, influye sobre el tamaño del feto; los fetos de animales con fuerte glucosuria son significativamente más pequeñas que los correspondientes a animales normales; estos fetos más pequeños presentan placentas más grandes y un contenido en glucógeno más elevado (Pitkin et al., 1.974).

Por otra parte, considerando que durante la gestación el metabolismo lipídico materno está estrechamente relacionado con los de placenta y feto, es importante conocer en detalle las funciones metabólicas de los lípidos placentales así como el origen de los lípidos fetales.

Mediante análisis químicos se ha demostrado que, desde el primer mes hasta el final, en humanos, se reduce el contenido de lípidos totales de la placenta; este hecho junto con la muy elevada concentración de fosfolípidos (durante el primer trimestre sobrepasa a la del hígado), contrasta con la "hipotética" naturaleza degenerativa de las grasas de este órgano. Considerando por otra parte que los fosfátidos disminuyen en gran cantidad durante el último mes, después de haber alcanzado elevadas concentraciones en los dos primeros trimestres (cuando el feto consume gran cantidad de ellos con fines estructurales y energéticos), es razonable pensar que tales moléculas atraviesan la placenta desde la madre al feto, aunque no excluye, ni mucho menos, la posibilidad de una transformación, en la placenta, de los fosfolípidos maternos.

Se ha demostrado también, por análisis químicos, que entre las semanas ocho y nueve de gestación, en humanos, hay una gran acumulación de triglicéridos y una considerable disminución de ácidos grasos libres en el sincitio; si se admite que los glicéridos se elevan en el feto, después de haber sido hidrolizados en el tejido placental, la

observación anterior indica la existencia de una gran actividad hidrolítica de los elementos sincitiales, y de un gran aporte de ácidos grasos al organismo fetal durante los siete primeros meses de gestación con respecto a los dos últimos, durante los cuales aparece en el feto una autonomía metabólica con una elevada capacidad de liposíntesis.

El empleo de isótopos radiactivos, en el estudio del origen de los lípidos fetales, en diversas especies animales, ha permitido establecer las siguientes conclusiones:

1.10.1. ORIGEN DE LOS TRIGLICERIDOS FETALES.

Los triglicéridos de la sangre materna son absorbidos por la placenta, hidrolizados en el sincitio y transferidos al feto como glicerol y ácidos grasos, junto con moléculas análogas sintetizadas por la placenta. El feto, a su vez, es capaz de sintetizar glicerol y ácidos grasos a partir de carbohidratos y proteínas. Se concluye, por tanto, que el organismo fetal puede sintetizar sus glicéridos a partir de precursores maternos, placentales y de origen endógeno (figura 3):

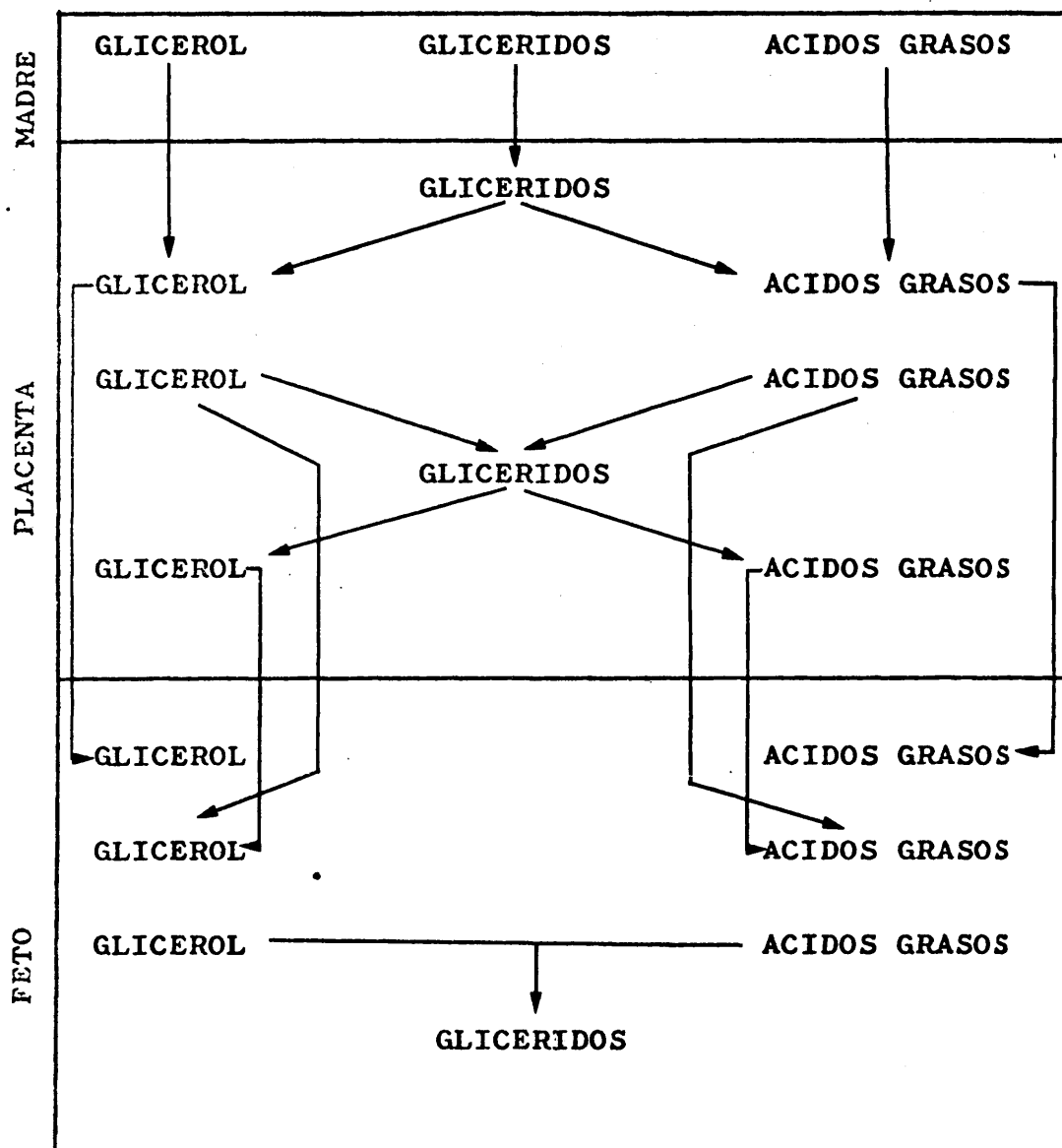


Fig. 3 Origen de los triglicéridos fetales

1.10.2. ORIGEN DEL COLESTEROL FETAL.

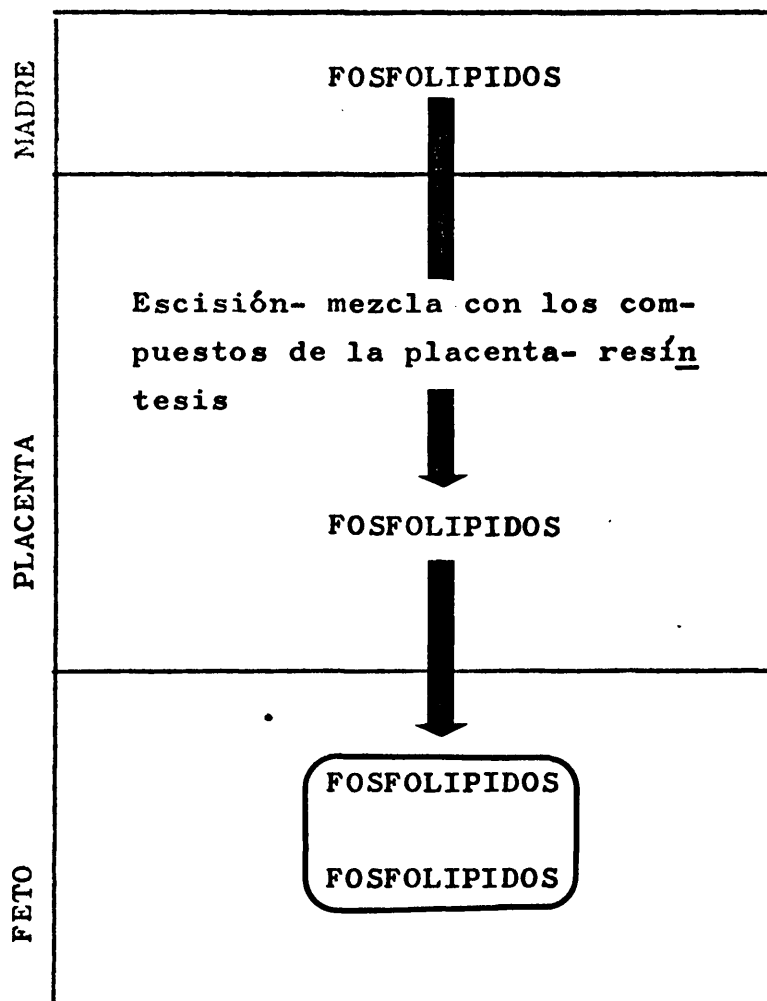
Los experimentos de Popjak (1.950, 1.954) realizados con conejos gestantes, pusieron de manifiesto que no existe una transferencia perceptible de colesterol de la

madre al feto y que el colesterol fetal es el resultado de la síntesis del mismo en los órganos fetales; conclusiones basadas del análisis de los tejidos maternos y fetales, después de la administración de D_2O y de acetato- ^{14}C a conejos gestantes. Sin embargo, más recientemente, otros investigadores encontraron que el colesterol atraviesa libremente la placenta, cuando administraban colesterol- ^{14}C a la madre (Connor et al., 1.965, 1.967; Coutts, 1.969; Plotz, 1.968). Estas observaciones divergentes se han encontrado para diferentes especies de animales. Posiblemente sean operantes ambos mecanismos: síntesis "de novo" y origen materno; hipótesis apoyada por el hecho de que, en conejos por ejemplo, los niveles de colesterol en plasma fetal son superiores a los de plasma materno. Por otra parte, puesto que el feto crece más rápidamente en el último período de gestación, es concebible que operen los dos mecanismos, con el fin de cubrir los requerimientos fatales de esteroides.

1.10.3. ORIGEN DE LOS FOSFOLÍPIDOS FETALES.

Los fosfolípidos de la madre son asociados por la placenta, rotos en sus componentes y vueltos a sintetizar formando moléculas diferentes a las de la madre, debido fundamentalmente a la abundancia de ácidos grasos poliinsaturados. Las diferentes fracciones de fosfolípidos de la placenta que están en relación cuantitativa diferente de la de la madre son cedidos al feto en proporciones diferentes para cada uno de ellos, de forma que en la sangre fetal su relación permanece similar a la de la madre. Con este mecanismo, la placenta satisface el requerimiento fetal de fosfolípidos poliinsaturados, sin perjudicar el balance entre las diferentes fracciones parece ser indispensable para la homeostasis. No se puede excluir que, junto a los fosfolípidos de origen placentar, el feto contiene pequeñas cantidades de fosfolípidos de origen endó-

geno (figura 4). (Biezenki et al., 1.971)



de origen materno
de origen placentar
de origen fetal

Fig. 4 Origen de los fosfolípidos fetales.

Biezenski (1.969), investigando conejos, puso de manifiesto la imposibilidad del hígado fetal para sintetizar fosfolípidos de plasma: inyectando $^{32}\text{PO}_4^{-3}$ a fetos extraídos de la madre al final de la gestación, observó una rápida incorporación de ^{32}P en fosfolípidos de hígado

y carcasa fetales; sin embargo, no se produjo ninguna incorporación en fosfolípidos de plasma, hasta 3 horas después de la inyección. Un experimento análogo lo realizó con conejos adultos normales, obteniendo una rápida incorporación en fosfolípidos plasmáticos. La consecuencia probable es que el hígado fetal no sintetiza fosfolípidos de plasma hasta varias horas después del nacimiento. Por lo tanto, puesto que ningún ácido graso esterificado se transfiere directamente al feto (Biezenski et al., 1.971; Mc Bride, 1.964; Biezenski, 1.962), se comprende que sea la placenta la principal fuente de fosfolípidos fetales. Biezenski, (1.971) apuntó la posibilidad de que fragmentos de fosfolípidos de origen materno pasen también a la circulación fetal incorporándose en lípidos de diferentes tejidos fetales.

1.10.4. ORIGEN DE LOS ACIDOS GRASOS LIBRES FETALES.

Los ácidos grasos del feto tienen un triple origen: materno, placentar y fetal (Popjak, 1.950; Van Duynne, 1.959, 1.962), figura 5.

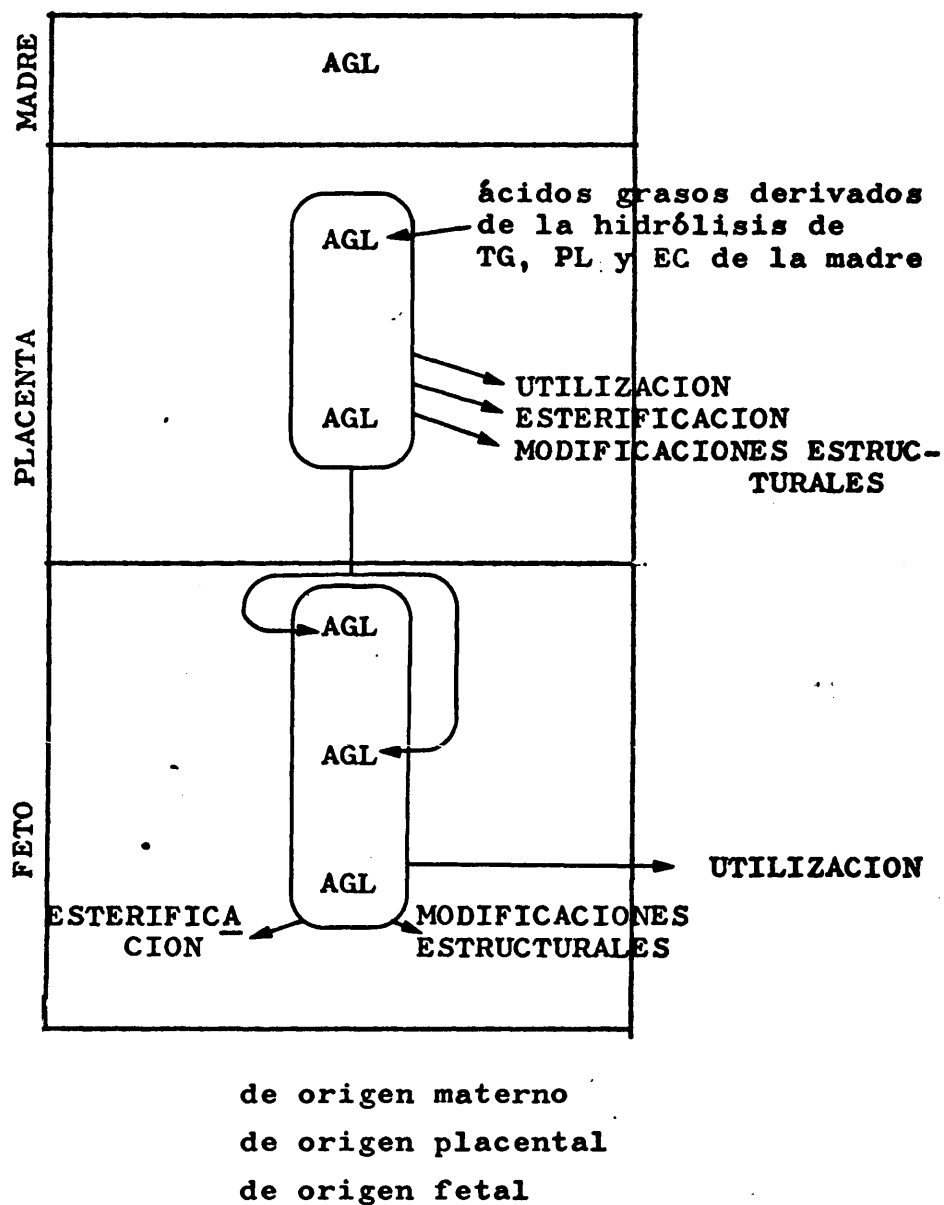


Figura 5. Origen de los ácidos grasos no esterificados fetales (AGL)

Varios investigadores encontraron la existencia de una lipoproteína lipasa placentar que es capaz de hidrolizar los ácidos grasos de los triglicéridos naturales circulantes (Mallov et al., 1.965). Por otra parte, Szabo et al. (1.973), en experimentos con perfundidos de placenta humana, demostraron que una considerable porción de ácido graso - ^{14}C era incorporado a la fracción de trigli-

céridos de los lípidos placentales; no es improbable, por tanto, que la transferencia de los ácidos grasos a través de la placenta incluya una reacción de esterificación transitoria (similar a la que ocurre en las células intestinales durante la absorción de grasa).

El transporte placentar de ácidos grasos libres varía mucho entre las especies, pero es particularmente considerable en conejo y cobaya (Van Duyne, 1.962; Mc. Bride, 1.964); el nivel de los mismos en plasma es más elevado en el feto que en la madre, al final de la gestación (Roux, 1.966), lo que sugiere una síntesis de ácidos grasos libres de plasma por parte del feto, posiblemente a partir de glucosa. En estas dos especies el fácil transporte, via placenta, de los ácidos grasos libres, va acompañado por elevados niveles de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Mc. Bride, 1.964), lo que apunta la posibilidad de que el transporte de lípidos en las VLDL en fetos de mamíferos esté relacionado con el "influjo" de los ácidos grasos libres. La secreción hepática de VLDL en adultos es función de la captura de ácidos libres por el hígado (Havel, 1.970).

Los experimentos de Noble et al. (1.971) con cordeños gestantes pusieron de manifiesto que la transferencia de ácidos grasos libres de la madre al feto, via placenta, es relativamente baja, así como que dicho órgano no es igualmente permeable para los diferentes ácidos grasos.

Es importante tener en cuenta, por último, la importancia, al menos cualitativa, del transporte de los ácidos grasos poliinsaturados esenciales de la madre al feto (Dancis, 1.962)

1.10.5. ORIGEN DE LAS LIPOPROTEINAS DEL PLASMA FETAL.

Con respecto al transporte de las lipoproteínas a

través de la placenta existen pocos estudios. En humanos, la sangre del feto tiene un contenido inferior de α -lipoproteínas y superior de β -lipoproteínas, que la madre. Sternberg (1.960), expuso la hipótesis de que la placenta sea impermeable a las β y, al menos, permeable en parte a las α .

1.11. ALGUNOS ASPECTOS SOBRE LAS RELACIONES HORMONALES MATERNO FETALES.

La importancia del estudio de las posibles relaciones que existen entre la madre y el feto, desde el punto de vista hormonal, radica en el hecho de que determinados desórdenes endocrinos de la madre pueden producir al feto daños irreversibles, si no se conocen estas interacciones.

Además de las hormonas que producen madre y feto, la placenta es el principal elemento de este sistema; no solamente regula el intercambio de sustancias entre las circulaciones materna y fetal, sino que es el sitio principal en la producción de hormonas (gonadotropina coriónica, lactógeno placentar, estrógenos).

Con respecto a la insulina parece existir acuerdo en que el feto sintetiza su propia hormona, poseyendo autonomía respecto a su producción y eliminación, ya desde las etapas previas de la vida intrauterina (Alexander et al., 1.968 (a); Basset, 1.971); sin embargo, no todos los autores están de acuerdo en lo que se refiere a los mecanismos de secreción en respuesta a conocidos estimulantes como la glucosa; no obstante, parece ser que la madurez del feto a este respecto se desarrolla en la última parte de la gestación y, en algunos casos, después del nacimiento (Willes et al., 1.968; Alexander et al., 1.968 (b)).

En cualquier caso, la placenta es impermeable a la insulina (Spellacy et al., 1.964; Adam et al., 1.968), al menos en hombre y en oveja, como se demuestra en la independencia de las concentraciones materna y fetal y por la ausencia de una transferencia neta en preparaciones de placenta perfundida.

La placenta no produce ninguna hormona tiroidea, ni forma parte de este sistema endocrino, excepto para regular el paso de la madre al feto. La hormona estimulante del tiroides (TSH) aparentemente no atraviesa la placenta y la actividad del tiroides fetal depende de la elaboración de TSH por la pituitaria del feto (Peterson et al. 1.952). El usual efecto feed-back, homeostático, de la tiroxina en la producción de TSH también pervalece en el feto. El tiroides fetal, en resumen, desarrolla capacidad para la completa producción de hormonas tiroideas desde el principio de la gestación; esto incluye: captura del yoduro, transformación a iodo, iodización de la tirosina y producción de triiodo tironina y tiroxina. Ambas atraviesan la placenta, si bien el paso es lento para la última.

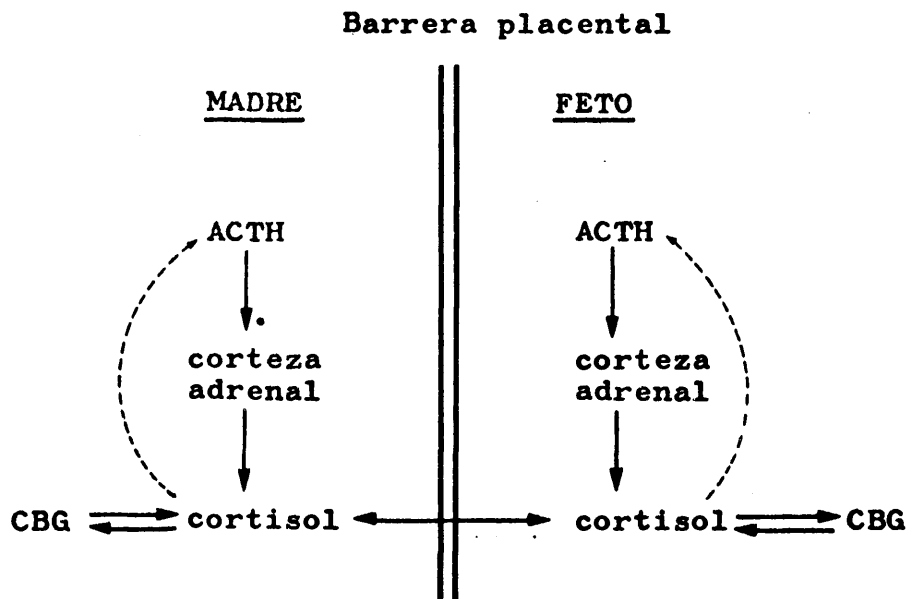
Un importante factor de control en la distribución de estas sustancias es la concentración de la proteína enlazante de la tiroxina (TBP) en suero materno y fetal. Una considerable fracción de tiroxina circulante se enlaza, en ambos, a esta proteína. Puesto que las proteínas no atraviesan la placenta, la distribución de tiroxina depende de la relativa "capacidad enlazante" de la sangre materna y fetal. Durante la gestación se produce en la madre un incremento de TBP. El feto desarrolla proteínas enlazantes de tiroxina, que son indistinguibles de las de los adultos pero están presentes en cantidades más pequeñas. Por lo tanto, debe existir un equilibrio que favorezca una distribución de las hormonas del tiroides entre ambas circulaciones.

En contraste con el tiroides, la glándula fetal adrenal es anatómicamente diferente de la del adulto y produce un conjunto de hormonas cuantitativamente diferente. Hay evidencia, tanto por estudios "in vivo" como "in vitro", de que la glándula adrenal fetal produce cortisol, el glucocorticoide fisiológico (Lanman, 1.961; Murphy et al. 1974). En la primera parte de la gestación humana, la mayor parte del cortisol atraviesa la placenta, transformándose en el feto en cortisona. Parece probable que la mayor parte de la cortisona materna de suero derive de la unidad feto-placental. En oveja, sin embargo, la placenta supone una significativa barrera en el movimiento materno fetal de cortisol; pero en ambas especies, los niveles del cortisol se elevan pocos días antes del parto y se supone que sea uno de los factores que inician el comienzo del mismo. Más evidencia de la independencia del cortisol fetal del de la madre son los elevados niveles del adrenal y la diferencia de niveles en circulación umbilical en feto humano en la mitad del desarrollo. Por otra parte, la ACTH materna no atraviesa la barrera placental y el desarrollo y función de la corteza adrenal del feto depende de la estimulación por ACTH procedente de la pituitaria fetal.

En rata la actividad adrenocorticotrópica se inicia entre los días 17 y 18 de desarrollo intrauterino (Milkovic et al., 1.973); los corticoides maternos pasan a través de la placenta y elevan los niveles de corticosterona fetal; como consecuencia de esto se bloquea la actividad adrenocorticotrópica de la pituitaria fetal. Parece ser que el objeto sobre el que actúan los corticoides maternos, la actividad adrenocorticotrópica, no opera hasta el día 17 del desarrollo intrauterino. Cuando esta función comienza, el exceso de corticosterona materna disminuirá, y su carencia estimulará la actividad adrenocorticotrópica fetal, por un mecanismo feed-back que opera en el desarrollo fetal, como han puesto de manifiesto Milkovic et

al. (1.970).

El cortisol es enlazado por proteínas de suero, la más importante de las cuales es una globulina específica (transcortina). Como en el caso de la tiroxina, la capacidad del suero materno para enlazar cortisol se incrementa durante la gestación y es mayor que en el feto (Sandberg et al., 1.965); esto puede favorecer elevadas concentraciones de cortisol en sangre materna y limitar su transferencia via placenta (figura 6)



CBG= cortisol binding globulin=globulina enlazante de cortisol

Fig. 6. Relaciones materno fetales adrenocorticotrópicas en la producción de cortisol.

Comparando con la función adrenal y del tiroides, el metabolismo de las hormonas sexuales durante la gestación es más complejo. En este sentido, además del control en la distribución entre la madre y el feto, la placenta es muy activa en la producción de estas hormonas. Parece existir una interdependencia entre placenta y feto, ya que cada uno le proporciona al otro precursores para la síntesis

sis de esteroides. Hormonas similares, producidas por un elemento, pueden ser metabolizadas por el otro. Las tres clases de hormonas sexuales, progestinas, estrógenos y andrógenos están también relacionadas en su síntesis y conversión. Estas relaciones complejas se están comprendiendo más cada día pero, en contra de lo que pudiera parecer, se conoce muy poco de la contribución de las hormonas sexuales en la salud materna y fetal. (Bengtsson et al., 1.964; Lyons et al., 1.968; Klevit, 1.966; Aarskog, 1.969; Rivarola et al., 1.968; Pearlman et al., 1.967).

1.12. METABOLISMO LIPIDICO FETAL.

1.12.1. IMPORTANCIA DEL METABOLISMO DE LIPIDOS PARA EL FETO.

El desarrollo y diferenciación de los órganos fetales necesita de la síntesis de nuevas estructuras celulares conteniendo fosfolípidos y esteroides. En el feto humano, aproximadamente a las 20-24 semanas de gestación, se observa un desarrollo enorme del tejido adiposo, que requiere como precursores ácidos grasos y glicerol. La gran acumulación de grasa en las 6 últimas semanas de gestación (5-10 gr./día) tiene lugar en el tejido adiposo del feto, lo que supone una reserva energética con vistas al incremento del consumo de energía del recién nacido, así como a su aislamiento térmico.

1.12.2. CONCENTRACION DE LIPIDOS Y COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DURANTE EL DESARROLLO.

Al final de la gestación, aproximadamente del 9-16% del peso total del feto humano son lípidos (Widdowson, 1.950); la acumulación de estos, al principio de la gestación, tiene lugar con una velocidad de 28-35 gr./día,

obteniéndose el máximo de 4,9 gr./día al final de la gestación. A las 10 semanas de desarrollo se puede extraer del feto 4,8 gr. lípidos/100 gr. de peso del feto (peso seco), concentración que va aumentando hasta el final del desarrollo.

Fosfolípidos y esteroides son las fracciones lipídicas que fundamentalmente se incrementan en placenta, cerebro, hígado y pulmón (Clausen et al., 1.965). Los fosfolípidos de pulmón se incrementan marcadamente entre las semanas 24-26 de gestación, lo que está de acuerdo con los descubrimientos histológicos en el feto humano; el pulmón cambia de una estructura acanalada a una alveolar y comienza a sintetizar agentes activos de superficie, como se verá más adelante.

Entre las semanas 8 y 28 de gestación, no se observa ninguna diferencia en la composición de ácidos grasos de cerebro, pulmón, hígado y placenta; sin embargo existen diferencias significativas entre los tejidos fetales y adultos. Los fetales contienen más palmítico y esteárico y menos oleico y linoleico que los adultos; sin embargo los fosfolípidos de pulmón contienen mucho más oleico que el tejido adiposo adulto (Hirsch et al., 1.960).

En el feto humano existen, en sangre, menos lípidos que en sangre materna (al final de la gestación la concentración de lípidos en suero fetal es tres veces más baja que la de la madre), y esta reducción tiene lugar en todas las fracciones lipídicas. Mediante análisis por cromatografía de gases, se han puesto de manifiesto, respecto a los ácidos grasos totales de plasma, los siguientes hechos:

- Existe un contenido menor de ácido linoleico y mayor de ácido araquidónico que en la madre.
- La presencia, en todas las fracciones lipídicas,

de ciertos ácidos grasos poliinsaturados, de cadena larga, que no son detectables en plasma materno.

- Una menor concentración de ácido linoleico en fosfolípidos, esteres de colesterol y glicéridos, así como un contenido mayor de eicosatrienoico en glicéridos y ácidos grasos libres.

Una de las razones que pueden tener esta serie de resultados es que el origen de los lípidos fetales, en las etapas previas de la gestación, esté en los ácidos grasos maternos que atraviesan la placenta, y que, a medida que avanza la gestación se va realizando una evolución hacia la síntesis "de novo" a partir de glucosa, que como se sabe, es uno de los metabolitos clave para el desarrollo fetal (Roux et al., 1.967).

La velocidad de transformación de linoleico en araquidónico es muy grande, que junto con la presencia de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, parece indicar una situación metabólica similar a la que se observa en animales con dieta libre de grasas.

A pesar de que el feto, al final del desarrollo intrauterino, parece poseer una autonomía lipometabólica, esta es incompleta y no incluye los ácidos grasos esenciales. así, el organismo fetal parece estar en un estado de deficiencia latente, demostrado por el hecho de que a pesar de la notable interconversión de linoleico en araquidónico, tiene una deficiencia de vitamina F; por ello cualquier disminución en sangre materna de estos ácidos grasos (diabetes y otros estados patológicos), así como cualquier alteración en el mecanismo mediante el cual estos compuestos son transferidos, vía placenta, acarreará el daño consiguiente para el feto.

Los ácidos grasos libres se liberan en grandes cantidades en la circulación del recién nacido (Roux, 1.967; Van Duyne, 1.965); esta liberación es, probablemente, secundaria a los cambios ambientales que ocurren después del nacimiento. Al nacer, se estimula el sistema nervioso simpático del feto, con la consiguiente liberación de ácidos grasos, que son utilizados por él como fuente de energía.

Existen diferencias considerables entre las especies, tanto en la composición como en la concentración de lípidos fetales. Como en el hombre, el conejo, cobaya, incrementan su contenido de lípidos en tejidos a lo largo de la vida intrauterina. La concentración de ácidos grasos libres en suero de feto de conejo y cobaya es más alta que la de la madre (Roux, 1.966; Hershfield et al., 1.968).

El feto de cordero, por el contrario, contiene menos lípidos que la madre (Body et al., 1.966). La concentración de lípidos en hígado de rata, ratón y cerdo, muestra un considerable incremento inmediatamente después del nacimiento, mientras que lo contrario ocurre en conejos (Roux 1.966; Morikawa et al., 1.965 y 1.966; Mersmann et al., 1.973).

El tejido adiposo humano está bien desarrollado al nacimiento, mientras que en mono rhesus está prácticamente ausente.

1.12.3. BIOSINTESIS DE LIPIDOS.

Popjak, (1.946, 1.950, 1.954), demostró que tanto en conejo como en cobaya, los tejidos fetales eran capaces de sintetizar ácidos grasos, colesterol y fosfolípidos y sugirió que el depósito de lípidos en el feto se debía,

probablemente, no a un aumento en la velocidad de síntesis sino más bien, a una disminución o ausencia del proceso degradativo. Más recientemente, Roux (1.966) y Beall (1.973), estudiando el metabolismo de lípidos "in vitro" en feto de conejo, encontraron que la velocidad de incorporación de ^{14}C en colesterol, triglicéridos y fosfolípidos disminuye desde el día 20, hasta el final de la gestación.

Las observaciones de Popjak, fueron posteriormente corroboradas en otras especies tales como cerdo, rata, ratón, mono y hombre (Fain et al., 1.966; Roux, Grigorian y Takeda, 1.967; Scott et al., 1.967; Smith et al., 1.970; Roux et al., 1.974; Alexander et al., 1.968 a).

Villee et al., (1.961), demostró que los tejidos fetales humanos pueden, tanto al principio como al final de la gestación, incorporar glucosa, fructosa, acetato, citrato y aminoácidos a lípidos, "in vitro" y que la velocidad de lipogénesis fetal es superior a la del adulto.

Ha sido opinión común, hasta hace poco, que los hidratos de carbono eran los únicos precursores de los lípidos fetales. Se ha puesto de manifiesto, sin embargo, que tanto "in vivo" como "in vitro", tiene lugar una transferencia de ácidos grasos y colesterol maternos a través de la placenta y que estos son incorporados a los lípidos fetales. Experimentos realizados con tejidos fetales humanos en las semanas 12 y 16 de gestación, pusieron de manifiesto que el palmítico ^{14}C se transforma en esteres de colesterol y fosfolípidos, en todos los tejidos estudiados. Se puede concluir, por tanto, que los tejidos fetales tienen capacidad para transformar ácidos grasos y glucosa en lípidos (Fain et al., 1.966; Scott et al., 1.967; Smith et al., 1.970; Villee et al. 1.961).

El cerebro fetal puede utilizar glucosa para la sín

tesis de lípidos (Sperry, 1.962), pero el hecho de que el palmítico pueda entrar en el tejido cerebral y convertirse en lípidos y esteroides, pone de manifiesto la posibilidad de una ruta alternante. El cerebro de feto es más permeable a las sustancias biológicas que el del adulto. Es por tanto posible que incorpore ácidos grasos del torrente sanguíneo a lípidos, lo que podría ser particularmente importante desde el punto de vista de que, de esta forma, el cerebro fetal puede obtener ácidos grasos esenciales que el hígado fetal no puede sintetizar.

El estudio del metabolismo lipídico pulmonar a nivel fetal reviste particularísima importancia desde que se descubrió que un fosfolípido - la dipalmitoil lecitina - es el responsable de las características de actividad superficial que posee el pulmón, y se vió que la principal causa de muerte en los fetos prematuros era atribuible a anomalías respiratorias debidas a un pulmón inmaduro cuya característica era, precisamente, la falta de actividad superficial.

Naturalmente, no toda la lecitina presente en el pulmón normal es agente activo de superficie; Gluck (1967a) separó lecitinas activas de las no activas, del parénquima pulmonar del feto de conejo, antes del día 29 de gestación, que es cuando aparece la lecitina con actividad superficial en el fluido alveolar. El parénquima residual de pulmón contiene el mencionado tipo de lecitina, lo que pone de manifiesto el posible almacenamiento de la misma en las células de pulmón fetal, mucho antes de su aparición en los espacios alveolares.

El pulmón fetal es un órgano inmaduro hasta prácticamente el término de la gestación; durante el período intrauterino, solo el 10% de la lecitina del fluido alveolar es "activa"; cuando el pulmón comienza a "respirar", la proporción de ella se incrementa rápidamente, dependiendo

do la velocidad de síntesis de lo avanzado de la gestación, hasta llegar a un 50% de la lecitina total en el feto a término, que es, aproximadamente, la proporción que existe en el fluido alveolar de conejo adulto. Los conejos nacidos prematuramente (28 días de gestación), presentan deficiencias respiratorias, observandose que el porcentaje de fosfolípidos "activos" en el fluido alveolar se incrementa mucho más lentamente que en los nacidos en di normal.

Gluck (1.967 b), estudió la biosíntesis de fosfolípidos en pulmón de feto de conejo, utilizando precursores diactivos, y observó que tienen lugar las mismas rutas que las conocidas en animales adultos, para la síntesis "de vo" de lecitina y fosfatidiletanolamina. En las rutas estudiadas "in vitro", la incorporación de CDP-colina fue sin duda el mecanismo más importante en la síntesis de lecitina, si bien la reacción de metilación a partir de fosfatidiletanolamina y S-adenosil metionina mostró un máximo significativo en el comienzo de la viabilidad del feto.

Realizando estudios comparativos,, se puso de manifiesto que en feto sin respiración, el incremento de lecitinas se produce, fundamentalmente, en el parénquima pulmonar, mientras que en el fluido alveolar, el incremento es mínimo. Sin embargo, cuando el pulmón lleva una hora respirando se produce en los alveolos un incremento en lecitinas 3-5 veces superior al producido en pulmón fetal sin respiración. Asimismo, se observó que la fracción de lecitina con actividad de superficie se incrementó unas 2-30 veces más en fluido alveolar de pulmón con respiración que en el correspondiente tejido fetal sin respiración. Los resultados ponen de manifiesto, como se mencionó más arriba, la existencia de un almacenamiento intracelular de lecitinas activas, previamente a su aparición en los alveolos, produciéndose la descarga en estos cuando comie

za la respiración. Parece ser que en feto de conejo, estos importantes cambios fisiológico-metabólicos tienen lugar a partir del día 28 de gestación.

Mediante el estudio de distribuciones posicionales de ácidos grasos en las posiciones 1 y 2 de las lecitinas, se llegó a la conclusión de que la actividad superficial está relacionada con un elevado porcentaje de ácidos grasos saturados en la posición 2 (además de en la posición 1, que es lo que generalmente ocurre) y concretamente de ácido palmítico. Sin embargo, otros ácidos grasos saturados, como el mirístico, parecen tener significación ya que, según los experimentos de Gluck, se incrementa en feto de conejo a término, en un 17% en la posición 2 de las lecitinas activas; asimismo, observó, por último, que a los dos días del nacimiento se alcanza cierto estado estacionario, cuando la composición de las lecitinas se hacen similares a las de conejo adulto.

Artom (1.968) estudió las enzimas de la biosíntesis de lecitinas via CDP-colina, en rata, y vió que alcanzan su mayor actividad en el momento del nacimiento, estando de acuerdo con otros trabajos realizados con el mismo material biológico (Weinhold, 1.968; Zachman, 1.969). Gluck (1.971) estableció que la ruta de la CDP-colina es activa después de 35 semanas de gestación en humanos. Asimismo, Zachman (1.972) sugirió que la ruta via S-adenosil metionina para la síntesis de lecitinas en niños recién nacidos no tiene significación en pulmón y que únicamente en hígado tiene un significado cuantitativo.

No hay que olvidar la posible importancia de la contribución del mecanismo de desacilación-reacilación en la biosíntesis de lecitinas activas (Veryken, 1.972) a lo largo del desarrollo fetal, si bien parece poseer mayor importancia en el adulto, con vistas al mantenimiento de una concentración idónea de agentes activos de superficie

pulmonares.

Por otra parte, no está todavía muy claro si la respiración intrauterina es un fenómeno anormal o, por el contrario, ocurre espontáneamente y es esencial para el desarrollo normal del pulmón; desde luego, por lo que se sabe hasta ahora, parece depender de las especies. En el feto de conejo, por ejemplo, se observan movimientos respiratorios al final de la gestación, y lo mismo en fetos de oveja (Dawés, 1.972). Sin embargo, en rata, gato y cobaya no se observa respiración intrauterina (Klein et al., 1.973).

Por último, es interesante resaltar la importancia del estudio de la concentración de fosfolípidos en el líquido amniótico en relación, o como predicción de la madurez fetal, desde que se sabe que el fluido del pulmón fetal pasa al fluido amniótico (Gluck L, 1.972; Whitfield, 1.972). El descubrimiento por Gluck et al (1.971) de que la relación entre lecitinas con actividad superficial y esfingomielina (L/S), en el fluido amniótico, aumentaba con la edad de la gestación, ha demostrado ser de gran importancia en la predicción del riesgo de "respiratory distress syndrome (RDS)". Varios grupos de trabajo han demostrado que la relación L/S es un método válido para la determinación de la madurez del pulmón fetal, al menos en gestaciones no complicadas (Borer et al., 1.971; Spellacy et al., 1.972; Bryson et al., 1.972). Sin embargo, otros grupos, utilizando esta técnica, encuentran poca relación entre L/S y RDS (Gudson et al., 1.972; Nelson, 1.972). Asimismo, Roux (1.971) ha cuestionado que esta relación sea real y cree que la relación es puramente accidental y pone en duda que la concentración de lecitina en el fluido amniótico esté relacionada directamente con la síntesis de sustancias activas de superficie, por parte del pulmón fetal.

1.12.4. DEGRADACION DE LIPIDOS.

Roux et al., (1.974) estudiaron el metabolismo, "in vitro", de ácido palmítico- ^{14}C y glucosa U- ^{14}C en tejidos de mono rhesus, durante el desarrollo, y observaron que un porcentaje de ellos se cataboliza a $^{14}\text{CO}_2$; no obstante, en los tejidos fetales el nivel de degradación a CO_2 es bajo.

Villee et al., (1.958), obtuvo el porcentaje de rotura de lípidos, midiendo la producción de CO_2 respiratorio cuando incubaba hígado fetal humano con lípidos radiactivos marcados. Placenta, cerebro, pulmón e hígado de fetos humanos de 12-13 semanas catabolizan palmítico a CO_2 . El cerebro fue el que tuvo la producción más baja de CO_2 , al contrario que hígado y placenta que tuvieron máxima. Roux et al., (1.974) observaron que en cerebro de mono rhesus la síntesis de lípidos disminuye después del nacimiento, aunque la utilización de glucosa y producción de CO_2 a partir de ella, se incrementan.

Estas observaciones indican que los tejidos fetales oxidan el palmítico a CO_2 mediante la acción catalítica de las enzimas de la α , β ó ω oxidación en conexión con el ciclo tricarboxílico. Aunque es difícil estimar el "pool" de ácidos grasos endógenos, el bajo nivel catabólico del cerebro sugiere un preferencial anabolismo de ácidos grasos, una baja permeabilidad celular, o bien, una baja utilización. Asimismo, la rotura de los ácidos grasos y su transporte dentro y fuera de la mitocondria son efectuados por las enzimas de la β -oxidación y la carnitin-palmitil-transferasa, que está presente en la placenta al final de la gestación (Karp et al., 1.971; Karp, 1.971). Todas estas evidencias demuestran que los tejidos fetales pueden catabolizar los ácidos grasos como los tejidos adultos.

1.12.5. INFLUENCIAS HORMONALES DURANTE EL DESARROLLO FETAL

Hay evidencia considerable de que, durante el desarrollo, los órganos endocrinos del feto controlan el metabolismo de lípidos.

Cuando se decapitan quirúrgicamente fetos de conejo o rata en varios tiempos del desarrollo, se observa que a pesar de ello el cuerpo continua creciendo normalmente hasta el final de la gestación (Bearn et al., 1.967; Picon 1.968), observandose en los animales sin hipófisis y sin tiroides un mayor contenido en lípidos que los controles (principalmente triglicéridos y colesterol). Sin embargo, este efecto no era observado, según Jost et al. (1.958), si se inyectaba, al feto, tiroxina en el momento de la de capitación. Estos datos demuestran que, tanto la pituitaria como el tiroides, controlan el metabolismo lipídico fe tal y que dicho control puede tener lugar a través de las conocidas actividades de la pituitaria y el tiroides, o bien, por algún agente lipolítico producido en la pituitaria; por otra parte, las correspondientes hormonas maternas, aun cuando puedan atravesar la placenta, no compensan la falta de ellas en el feto (Bearn et al., 1.961); tanto es así que el incremento de grasa en fetos humanos anormales es debido a alteraciones hormonales en ellos; así, la pituitaria de los anancefálicos está reducida de tamaño y, secundariamente a esto, las adrenales son extre madamente pequeñas.

El contenido de fosfolípidos en cerebro de feto de conejo no se afecta por la administración, a la madre, de metil tiouracilo, a pesar de que esta sustancia atraviesa la placenta e inhibe la secreción fetal de tiroxina (Cuaron et al., 1.963). El por qué de esta discrepancia aparen te se debe, posiblemente, a que las células cerebrales de feto que sintetizan los fosfolípidos, no son foco de acción

de la tiroxina, en útero. En humanos se ha visto también que la pituitaria y adrenales fetales controlan el depósito de tejido adiposo.

Puesto que la síntesis de lípidos depende de la glucosa y de la disponibilidad de ácidos grasos en el tejido, son importantes las acciones de la insulina, glucagón y hormona del crecimiento.

Se ha observado que la insulina está presente en el páncreas del feto humano, ya en el primer trimestre de gestación (Schwartz, 1.968). Las investigaciones sobre el funcionamiento celular de los islotes pancreáticos fetales y de recién nacidos en una gran variedad de especies: rata (Heinze et al., 1.971); oveja (Willes et al., 1.969) y monos rhesus (Mintz, et al., 1.969), ponen de manifiesto que los islotes pancreáticos fetales son insensibles a la estimulación glucémica y que la adaptación del recién nacido a la vida extrauterina va acompañada de la aparición de la liberación de insulina, estimulada por glucosa. Por otra parte, los resultados de varios estudios sugieren una relación entre el sistema adenil ciclase de los islotes fetales y la liberación de insulina estimulada por glucosa. Así, Chez et al. (1.971), pusieron de manifiesto que la administración intravascular de teofilina y glucosa juntas a feto intacto de macaco "in vivo" va acompañada de un aumento en los niveles de insulina en el plasma fetal, mientras que glucosa o insulina juntas son incapaces de producir este efecto. A los mismos resultados se llegó, también, con otras especies (Milner et al., 1.973; Sodoyez-Goffaux et al., 1.971; Milner, 1.969 a; Milner et al., 1.972). Aunque, como ya se ha mencionado, se posee amplia información sobre la presencia de insulina en el páncreas desde una etapa temprana de la vida intrauterina (Milner et al., 1.971; Milner, 1.969 b), se sabe poco acerca de los mecanismos que controlan su secreción. Chez et al.,

1.971, han postulado que en los islotes fetales, o está disminuida la actividad de adenil ciclasa o aumentada la de fosfodiesterasa, o ambas cosas a la vez, explicando así el fallo aparente de la glucosa para inducir la liberación de insulina. Ahora bien, se dispone actualmente de una evidencia considerable en el sentido de que es muy improbable que la glucosa ejerza su efecto insulinogénico solamente por provocar la acumulación intracelular de AMPc (Brisson et al., 1.972). Cualquiera que sea el mecanismo de insensibilidad del feto a la glucosa parece ser selectivo para este azúcar, ya que la administración de glucagón, tolbutamida y mezclas de aminoácidos a fetos humanos y de primates van asociados a una liberación de insulina, indicando que el mecanismo de su secreción está intacto.

Es posible que alteraciones en el metabolismo intermedio de la glucosa en las células de los islotes pancreáticos, combinadas con un incremento en los niveles de AMPc en dichas células, estén directamente relacionadas con la aparición de la liberación de insulina, mediada por glucosa. Así Heinze et al., (1.971), han observado que el metabolismo de glucosa en células de islotes pancreáticos de feto y recién nacido, en rata, está alterado, observandose un aumento relativo del ciclo de las pentosas, que tiene lugar coincidiendo con la liberación de insulina mediada por glucosa en el recién nacido de 1-2 días, etapa en la que se observó un incremento muy significativo de AMPc y fosfodiesterasa (Mintz et al., 1.973).

El glucagón, lo mismo que la teofilina, puede iniciar la liberación de insulina por parte del páncreas fetal (Milner et al., 1.973).

Alexander et al., (1.969) y otros investigadores encontraron que en feto de oveja sí existe una liberación de insulina en respuesta a una inyección intravenosa de glucosa, si bien dicha liberación sufría un retardo con

respecto al azucar.

También ha sido detectada en sangre fetal la hormona de crecimiento, con una mayor concentración en la sangre venosa; es presumible que sea segregada por la pituitaria fetal (Yen, 1.965). Sin embargo la respuesta de la hormona de crecimiento fetal a conocidos estímulos, es mínima; así, una inyección directa de insulina a feto de mono rhesus no produce liberación apreciable de la hormona de crecimiento, y tampoco produce efecto una hipoglucemia fetal (Mintz et al., 1.969). Estas observaciones indican que, como en el caso de la insulina, a pesar de que los órganos endocrinos fetales producen hormonas similares a las del adulto, su regulación durante el desarrollo intrauterino es muy diferente a la observada después del nacimiento.

Smith et al., (1.974) estudiaron el efecto del cortisol sobre células de pulmón de feto de conejo en cultivo, entre los días 20-28 de gestación, centrándose fundamentalmente en dos aspectos: a) crecimiento celular, determinado por el contenido en DNA, después de 72 horas; en este momento todos los cultivos estaban en fase de crecimiento exponencial y b) madurez celular, medida por la incorporación de palmítico ^{14}C en lecitinas saturadas y su liberación al medio de cultivo. El cortisol incrementa el crecimiento celular pulmonar de feto al principio de la gestación, y a medida que se acerca al término, estimula la maduración y detiene el crecimiento celular.

En general, la administración de esteroides, con diferentes actividades glucocorticoides, acelera el proceso de maduración del pulmón fetal (de Lemos et al., 1.970; Kotas et al., 1.971; Taensch et al., 1.972; de Lemos et al., 1.973).

Por último, Menon et al., (1.973), estudiaron las actividades de adenil ciclasa en varios tejidos fetales hu-

manos y vieron que los requerimientos de dicha enzima son similares a los de los adultos. De todos los tejidos investigados el corazón (tejido ventricular) fué el que tuvo una actividad enzimática superior y asimismo, este tejido fue el de mayor capacidad de respuesta a la estimulación hormonal. Aunque todas las adenil ciclasas procedentes de los diferentes tejidos se estimularon por F-, la influencia hormonal fue observada unicamente en hígado, glándula adrenal y corazón. La presencia de sistemas adenil ciclasa que son sensibles a hormonas sugiere que el AMPc puede estar relacionado con la expresión genética.

2. M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

2.1. MATERIAL BIOLOGICO.

Toda la experimentación se ha llevado a cabo con conejas hembras, de raza neozelandesa blanca (3,0-3,5 Kg. de peso y 4-6 meses de edad), mantenidos en jaulas independientes, en una habitación, debidamente acondicionada a 22-26° C. de temperatura. La alimentación se realizó siempre con un pienso común para conejos (UFAC, tipo L. 30); el agua fue administrada a discreción.

Los estudios se han realizado en 4 series diferentes de animales: control, no gestante tratado con insulina, gestante normal y gestante tratado con insulina. La edad de gestación ha sido siempre exactamente conocida. Las experiencias se han realizado a lo largo del período de gestación, hasta el día 29 de la misma, en que los animales son sacrificados (el alumbramiento se produce en los días 30-31 de gestación).

2.2. ADMINISTRACION DE INSULINA.

Se utilizó insulina cristalina, libre de glucagón (Nordisk Insulinlaboratorium, Copenhagen, 28,5U/mg. de material anhidro).

La administración a los animales tratados se realiza por via subcutánea, inyectando una dosis de 1,0 U disuelta en agua estéril/día/animal, a partir del séptimo día correspondiente al comienzo de la gestación y a lo largo de todo el período de la misma. La administración a los animales no gestantes se hace coincidir con los mismos días ya que las experiencias se llevan a cabo simultáneamente en todos los tipos diferentes de animales.

2.3. ANALISIS CUANTITATIVO DE LIPIDOS DE SUERO.

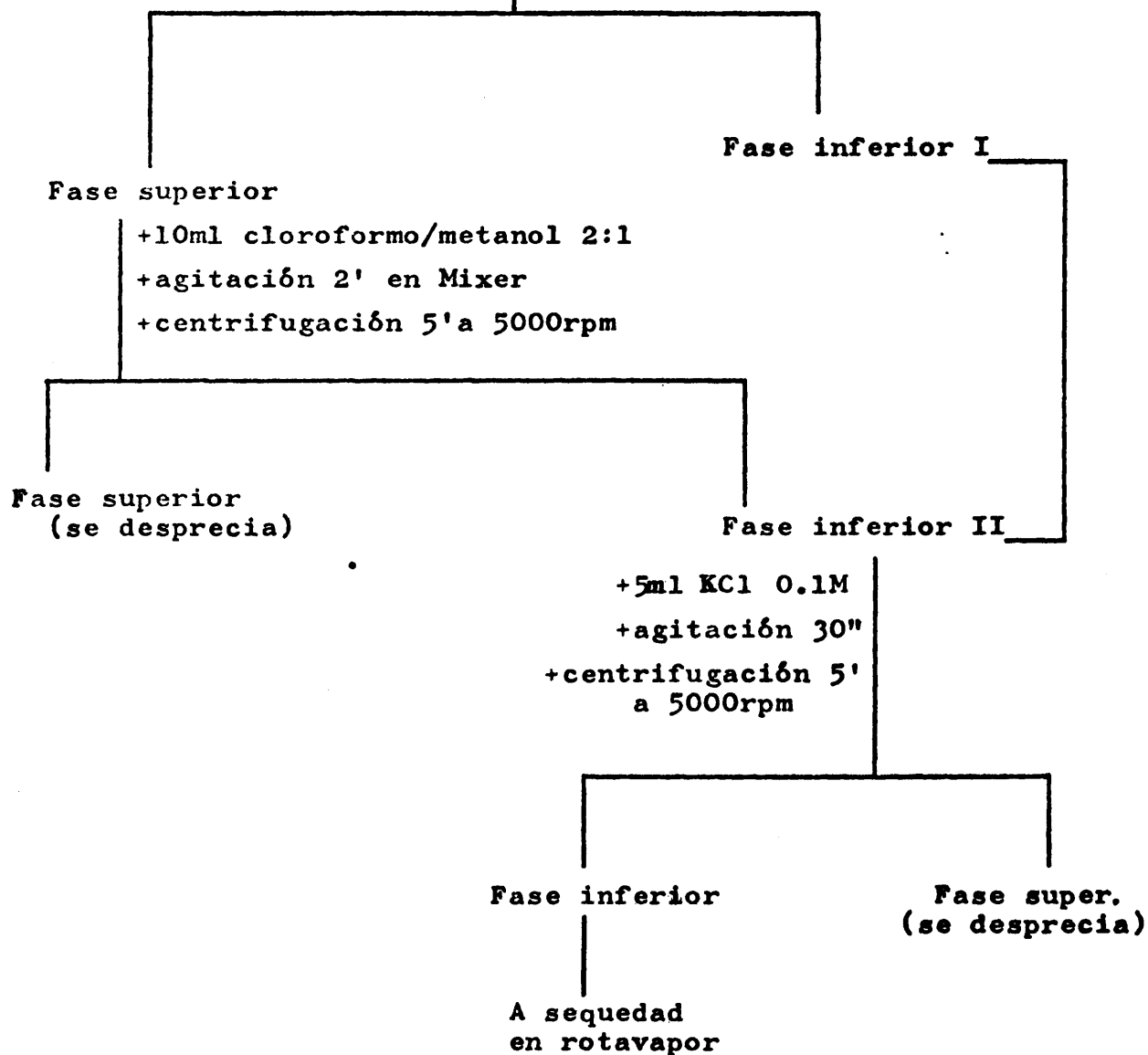
2.3.1. AISLAMIENTO DE LÍPIDOS TOTALES.

Todas las tomas de sangre se realizaron de la vena periférica de la oreja, tras un ayuno de 18-20 horas. Para la obtención del suero se centrifuga la sangre a 3.000 r.p.m. tras un reposo de una hora.

El aislamiento de lípidos totales del suero se efectuó según una modificación al método de Folch (1.951): 2 ml. de suero se extraen dos veces con 10ml. de cloroformo/metanol (2:1); los extractos clorofórmicos reunidos se lavan con 5 ml. de KCl 0,1M y la fase clorofórmica se extrae mediante centrifugación, evaporándose a sequedad, a continuación, en un evaporador rotatorio a 15-20 mmHg de presión a una temperatura no superior a 40°C:

SUERO (2ml)

- + 10ml cloroformo/metanol 2:1
- + agitación 2' en Mixer
- + centrifugación 5' a 5000rpm



2.3.2. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Para la separación de los lípidos polares de los neutros, así como para separar las diferentes clases de los últimos, se ha utilizado cromatografía en capa fina

monodimensional, y bidimensional para la obtención de las diferentes clases de fosfolípidos.

Las placas que se utilizan para la realización de las cromatografías son de vidrio, de dimensiones de 20x20 cm. y la extensión del soporte se realiza con un extendeder Shandon. El adsorbente utilizado es Silicagel G (E. Merck Darmstadt. Alemania), con un espesor variable según el tipo de cromatografía (600 μ para monodimensional y 300 μ para bidimensional).

La suspensión de la Silicagel G se preparó en cada caso inmediatamente antes de la extensión sobre las placas, y de acuerdo con las siguientes proporciones:

30 gramos de Silicagel G/60 ml H₂O destilada: espesor 300 μ

45 gramos de Silicagel G/85 ml H₂O destilada: espesor 600 μ

en ambos casos para obtener 5 placas de las dimensiones mencionadas, que se dejan secar unos 20 minutos a temperatura ambiente; a continuación se introducen una hora en estufa a 110-120°C, después de lo cual se dejan enfriar a temperatura ambiente, para proceder a su utilización.

Los sistemas empleados para el desarrollo de las cromatografías son los siguientes:

Lípidos neutros

n-Hexano/éter/acético (70:30:1 , V/V/V)

Lípidos polares

- I) Cloroformo/Metanol/amomiaco 7M (90:54:11, V/V/V)
- II) Cloroformo/Metanol/acético/agua (90:40:12:2, V/V/V/V)

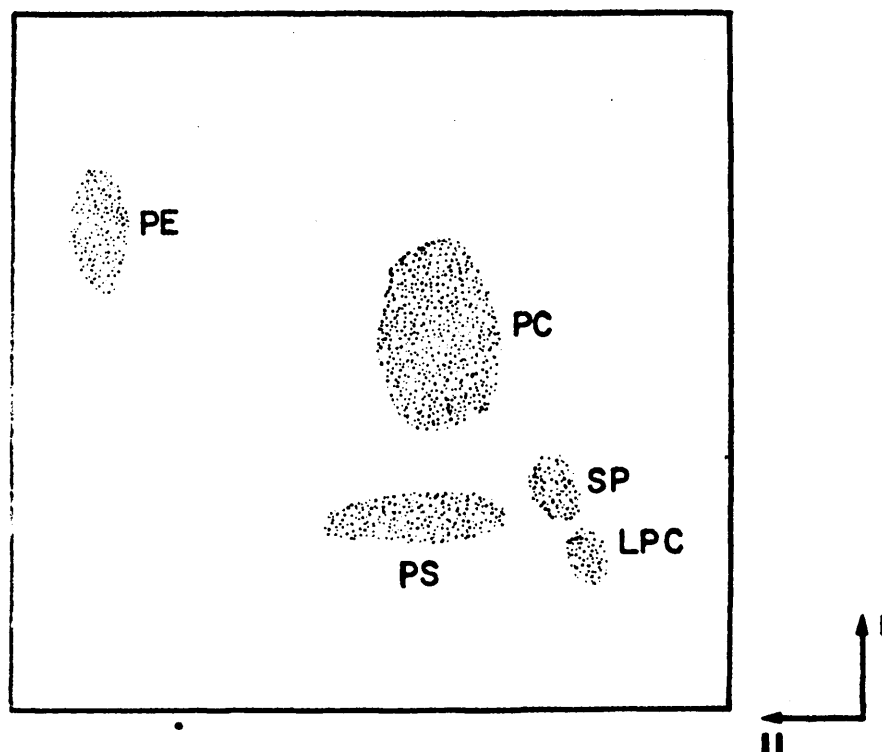
En ambos casos, una vez desarrolladas las cromato-

gráficas, se dejan las placas a temperatura ambiente con el fin de que se evapore todo resto de disolvente; los lípidos se visualizan introduciendo las placas cromatografiadas en una cubeta saturada de vapores de yodo (Mangold et al., 1.961; Sims et al., 1.962). En poco tiempo el yodo se absorbe selectivamente sobre las regiones donde han quedado situadas las diferentes clases de lípidos, originándose manchas amarillas perfectamente visibles sobre el fondo blanco de la placa. Cada banda se identifica comparando su recorrido con el de los patrones. Después de enmarcar, con un punzón, cada banda, se hace sublimar el yodo, dejando la placa al aire ó bien calentando ligeramente en estufa. Eliminada completamente el yodo, se raspan cuidadosamente las manchas correspondientes a los lípidos cuya cantidad interesa analizar, procediéndose a la realización de los diferentes métodos de análisis.

2.3.3. ANALISIS CUANTITATIVO DE FOSFOLIPIDOS

2.3.3.1. ANALISIS DE CLASES DE FOSFOLIPIDOS.

Los lípidos correspondientes a 1 ml. de suero, extraídos de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.3.1., se aplican en un punto, sobre placas de Silicagel G de 300 μ previamente lavadas mediante desarrollo de las mismas en un sistema de composición: metanol/cloroformo/fórmico (2:1:1, V/V/V) y secadas a temperatura ambiente durante 12 horas, con el fin de evitar fondos oscuros sobre la placa que impidan la buena visualización de los fosfolípidos. Las placas se desarrollan en los sistemas (I y II), mencionados en el apartado anterior para lípidos polares; una vez realizada la cromatografía y evaporado el resto de disolvente, los fosfolípidos se visualizan por introducción de las placas en una cubeta de yodo y se delimitan las manchas correspondientes a : lisofosfatidilcolinas (LPC), esfingomielinas (SP), fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolaminas (PE) y fosfatidilserinas (PS):



Una vez sublimado el yodo se raspan las manchas correspondientes con una espátula y se transfieren a unos matraces Kjeldhal. El conjunto de los matraces es sometido luego a las siguientes operaciones (Rouser et al., 1.966):

Se adicionan 0,9 ml de ácido perclórico al 70%, a cada uno de los matraces y se introducen en un baño de arena, durante 25 minutos, a 250-260°C, con el fin de mineralizar el fósforo orgánico.

Una vez transcurrido el tiempo se retiran los matraces y se dejan enfriar a temperatura ambiente.

A cada matraz se le adicionan agua destilada y reac

tivos, de acuerdo con el siguiente orden:

- 1) 7 ml de agua destilada
- 2) 1 ml de solución de molibdato amónico al 25% (P/V)
- 3) 1 ml de solución de ácido ascórbico al 10% (P/V)

A continuación los matraces se calientan en un baño de agua hirviendo, durante 7 minutos, al cabo de los cuales se detiene la reacción por inmersión de los matraces en un baño de hielo. Seguidamente se elimina el ácido silícico de cada muestra por centrifugación del contenido de cada matraz, a 3.000 r.p.m., durante 5 minutos. Por último se leen las densidades ópticas a 820 m μ en un fotocolorímetro equipado con filtro rojo.

Las cantidades de cada fosfolípido se obtuvieron contrastando las densidades ópticas frente a una curva patrón, construida con una solución de fosfato inorgánico de concentración exactamente conocida y de acuerdo con la metodología descrita, eliminando el paso previo de mineralización del fósforo.

En ambos casos se leen las densidades ópticas frente a un blanco que contiene:

- 0,9 ml de ácido perclórico
- 7 ml de H₂O destilada
- 1 ml de solución de molibdato amónico al 2,5%
- 1 ml de solución de ácido ascórbico al 10%

Sometido durante 7 minutos a 100°C en un baño de agua hirviendo.

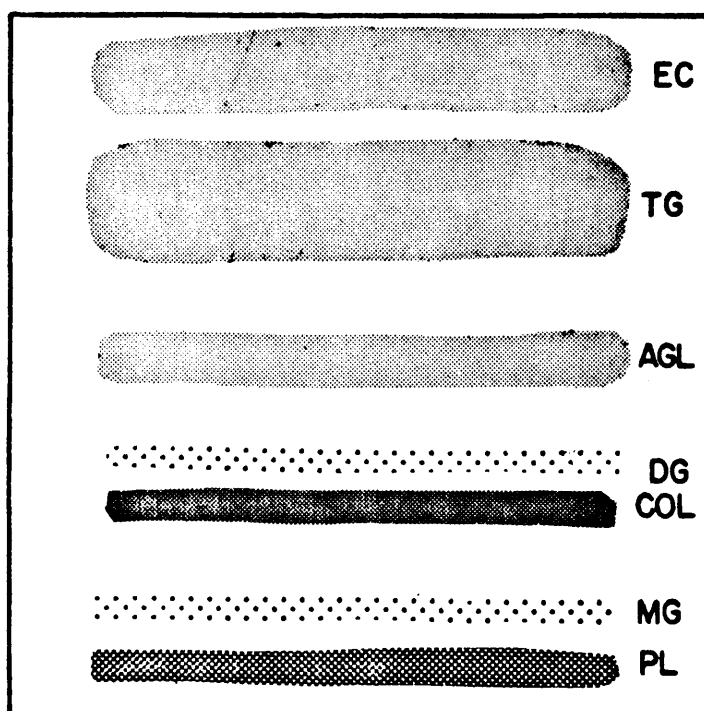
Este método es sensible entre 1 y 8 μ g. de fósforo por muestra. Para cantidades superiores a estas se debe proceder a una dilución una vez desarrollado el color, contrastando las densidades ópticas frente a una curva

patrón realizada con idéntica dilución.

2.3.3.2. ANALISIS DE FOSFOLIPIDOS TOTALES

Los lípidos totales correspondientes a 1 ó 2 ml de suero, se aplican en banda continua (de unos 5 cm.), sobre placas de Silicagel G, de 600 μ de espesor, que se desarrollan en el sistema de disolventes correspondiente a lípidos neutros (apartado 2.3.2.). Una vez realizada la cromatografía y eliminado el disolvente, las placas se someten a vapores de iodo.

Según este tipo de cromatografía, el conjunto de los fosfolípidos permanece en el origen (PL), separándose, por el contrario, las restantes especies lipídicas menos polares, entre sí. De esta forma se obtienen, perfectamente diferenciados, los monoglicéridos (MG), colesterol (COL), diglicéridos (DG), ácidos grasos libres (AGL), triglicéridos (TG) y esteres de colesterol (EC), de acuerdo con su polaridad:



La mancha correspondiente a los fosfolípidos totales se raspa cuidadosamente, una vez sublimado el yodo, y se transfiere a un matraz Kjeldhal y se procede a su valoración de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.3.3.1.

2.3.4. ANALISIS CUANTITATIVO DE TRIGLICERIDOS.

De la misma placa de cromatografía que la utilizada para la obtención de los fosfolípidos totales (2.3.3.2.), la zona correspondiente a los triglicéridos se raspa y transfiere a un tubo de vidrio (boca esmerilada, B-19) con el fin de extraer los triglicéridos adsorbidos sobre la Silicagel G. El proceso de extracción transcurre de acuerdo

do con los pasos siguientes:

- 1º) triglicéridos adsorbidos sobre silicagel + 10 ml de cloroformo
 agitación 2 minutos en un mixer
 centrifugación 6 minutos a 7.000 r.p.m.
 extracción de la fase clorofórmica
- 2º) residuo de silicagel + 10 ml de cloroformo
 agitación 2 minutos
 centrifugación 6 minutos a 7.000 r.p.m.
 extracción de la fase clorofórmica
- 3º) reunión de las dos fases clorofórmicas
 evaporación a sequedad en un evaporador rotatorio, a baja presión.

El residuo seco de triglicéridos se valora de acuerdo con el método de Skidmore (1.962), basado en la transformación de los esteres en ácidos hidroxámicos, que forman con el ion férrico (Fe^{3+}) un complejo coloreado, que se determina colorimétricamente mediante lectura de las densidades ópticas a $530 \text{ m}\mu$ en un fotocolorímetro. Las cantidades de triglicéridos se obtienen contrastando las densidades ópticas frente a una curva patrón construida con una solución clorofórmica de un triglicérido (tripalmitina, trimiristina) de concentración perfectamente conocida.

2.3.5. ANALISIS CUANTITATIVO DE ACIDOS GRASOS LIBRES.

La valoración de ácidos grasos libres se realiza por determinación directa sobre el suero, de acuerdo con el método de Dole et al., (1.960), modificado por Ko y Royer (1.967): un volumen conocido de suero (0,5-1 ml.) se extrae con una mezcla de extracción formada por alcohol isopropílico/n-heptano/ H_2SO_4 1N (40:10:1, V/V/V). La fase orgánica que contiene los ácidos grasos libres se extrae

después de agitación y centrifugación y se titula con hidróxido de tetrabutylamonio 0,001 N, utilizando como indicador una disolución de timolftaleína 0,01% en acetona y gaseando continuamente con nitrógeno, con el fin de evitar la disolución en el medio del CO_2 ambiental, que conduciría a una determinación errónea.

2.3.6. ANALISIS CUANTITATIVO DE COLESTEROL TOTAL.

La mezcla de colesterol libre y esterificado se valora, también, directamente del suero, según el método de Zak et al., (1.954) y Henly (1.957): a 0,1 ml de suero, se añaden 10ml de una solución de FeCl_3 en ácido acético (0,05% P/V) la mezcla se agita y se deja reposar 15 minutos, con el fin de conseguir que la floculación de las proteínas séricas sea completa; una vez transcurrido este tiempo se centrifuga 5 minutos a 5.000 r.p.m.; a continuación se toman 5 ml del sobrenadante, a los que se añaden 3 ml de ácido sulfúrico concentrado, dejando la mezcla en reposo, después de una ligera agitación, durante 30 minutos, a partir de los cuales el color desarrollado es estable, momento en que se miden las densidades ópticas a 560 $\text{m}\mu$ en un fotocolorímetro, frente a un blanco en el que se ha sustituido el suero por 0,1 ml de NaCl al 0,9% (P/V). Las densidades ópticas obtenidas se contrastan frente a una curva patrón, en cuya construcción se ha utilizado una solución de colesterol en ácido acético.

Es interesante hacer notar la importancia que tiene una agitación inmediata a la adición de los 3 ml de ácido sulfúrico concentrado, con el fin de obtener resultados correctos.

2.3.7. ANALISIS DE LIPOPROTEÍNAS.

La separación de lipoproteínas séricas se lleva a cabo por electroforesis en gel de poliacrilamida, utilizando una modificación al método de Pratt, et al. (1.969): se preparan disoluciones discontinuas de poliacrilamida que contienen, respectivamente, el 2% (1 cm de altura), 2,5% (0,5 cm de altura), 3,0% (0,5 cm de altura) y 6,5% (5 cm de altura), de acrilamida. Se utiliza como colorante Sudan black B (colorante para lípidos, que tiñe, específicamente, la parte lipídica de las lipoproteínas) de acuerdo con el método propuesto por Mc. Donald, et al. (1.959). A continuación se procede al densitometrado de los geles en un densitómetro Canalco, equipado con un integrador automático.

2.4. EXTRACCION DE LIPIDOS TOTALES DE TEJIDOS.

Todos los animales se sacrifican el día correspondiente al día 29 de gestación de los gestantes, mediante una inyección de aire en la vena periférica de la oreja; la muerte se produce inmediatamente, en pocos segundos. Los órganos maternos (pulmón, hígado y tejido adiposo) son extraídos inmediatamente, lavados en una disolución de NaCl al 0,85% fría, e introducidos en aire líquido hasta su utilización posterior. En el caso de los animales gestantes, los fetos son obtenidos por cesárea y sacrificados simultáneamente por decapitación; los órganos fetales (pulmón e hígado) son extraídos rápidamente, lavados con NaCl 0,85% frío, e igualmente, introducidos en aire líquido.

Para la extracción de los lípidos totales, los tejidos congelados son expuestos a temperatura ambiente, hasta que se obtiene la consistencia normal. Posteriormente, los tejidos, debidamente troceados se homogeneizan en un Omni-Mixer (Sorvall), con cloroformo/metanol (2:1, V/V) (20 ml de cloroformo/metanol/gr. de tejido), de acuerdo con el método de Folch, (1.951). La suspensión clorofór-

mica se lava con una solución de KCl 0,1M (0,25 ml/ml sus
pensión clorofórmica), se agita y se centrifuga 5 minutos
a 5.000 r.p.m.; la fase inferior clorofórmica se extrae y
deja secar sobre Na_2SO_4 anhidro, durante unas horas; una
vez seca se separa del Na_2SO_4 por filtración y se evapo
ra a sequedad en un evaporador rotatorio a baja presión.

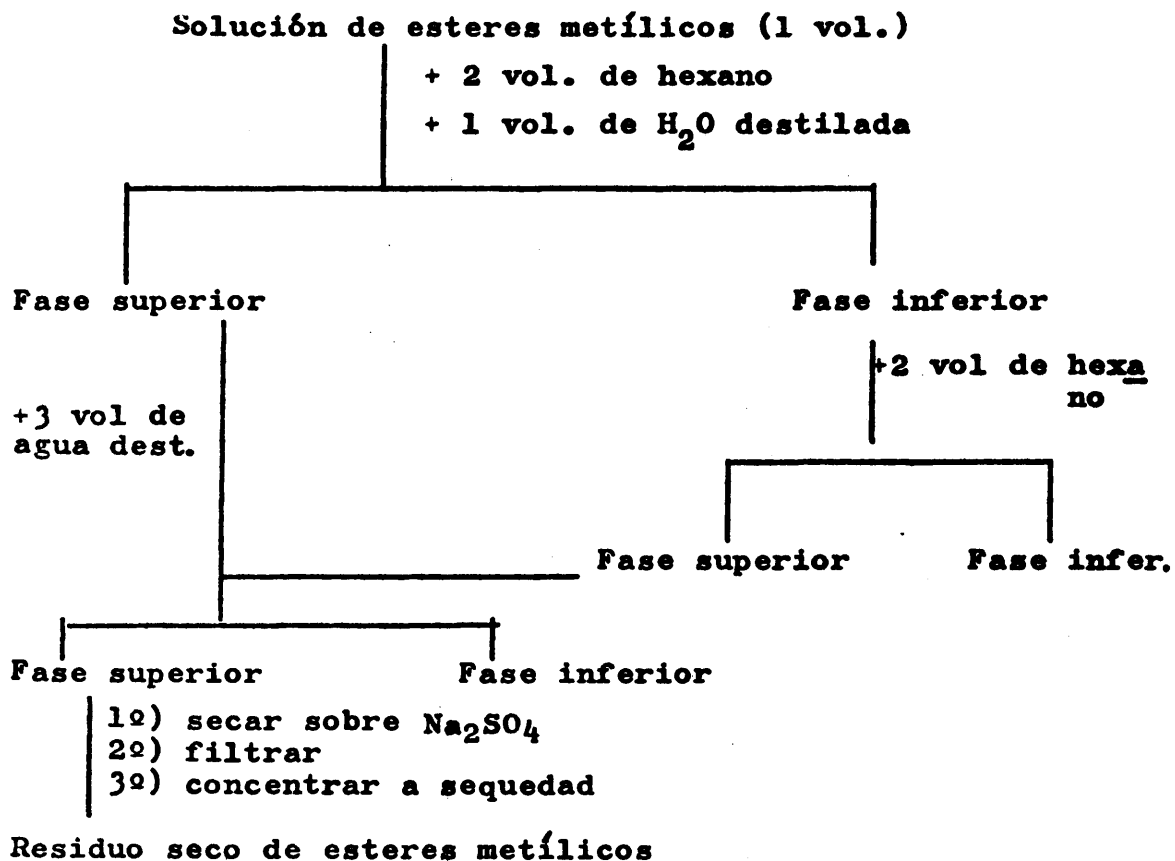
Durante todo el proceso de extracción, la fase cloro
fórmica se gasea constantemente con N_2 a fin de evitar la
posible oxidación de los lípidos. En algunas ocasiones se
utilizó un antioxidante, BHT, que es añadido al comienzo
de la extracción, si bien no es muy aconsejable su utili-
zación por producir interferencias en el análisis posterior
de los lípidos por cromatografía de gases, si no se to-
man las correspondientes medidas de purificación.

2.4.1. SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LOS LIPIDOS TOTALES DE TEJIDOS.

La separación de las diferentes clases lipídicas se
lleva a cabo por cromatografía en capa fina, sobre placas
de Silicagel G (20x20 cm.), de 600 μ de espesor; el resi-
duo seco de lípidos totales se disuelve en cloroformo/Me-
tanol (2:1, V/V) y se aplican sobre las placas en banda
continua (16 cm.; 20 mg. de lípidos totales) y se desa-
rollan en n-hexano/éter/acético (70:30:1, V/V/V). Las ban
das correspondientes a triglicéridos y fosfolípidos se de
tectan pulverizando las placas, una vez secas de disolven-
te, con Rodamina 6G (0,1% en metanol) (Mangold et al., 1961)
los lípidos aparecen como manchas rosas sobre fondo naran-
ja. Bajo la luz ultravioleta se destaca más el contraste
entre la mancha y el fondo; no destruye los lípidos y por
esta razón es el revelador utilizado siempre que se pro-
ceda a un análisis de ácidos grasos.

2.5. ANALISIS DE ACIDOS GRASOS TOTALES Y DE TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS DE TEJIDOS. OBTENCION DE ESTERES METILICOS Y ANALISIS.

Un extracto de lípidos totales, así como las bandas correspondientes a triglicéridos y fosfolípidos que se rasparon, se metanolizaron de acuerdo con el método de Metcalfe y col. (1.961): los lípidos se sitúan en tubos de vidrio (ya sean puros o adsorbidos sobre Silicagel), de paredes gruesas de 20x150mm y se agregan 1 ml. de metanol reactivo (C. Erba), 1 ml. de trifluoruro de boro-metanol al 14% y 0,9 ml de benceno, por cada 10 mg. de lípidos. Los tubos se cierran con soplete, bajo atmósfera de nitrógeno y la mezcla se mantiene a 110°C, durante 1 hora y 30 minutos. Transcurrido este tiempo, los tubos se enfrían a temperatura ambiente y se abren. La extracción de los esteres metílicos se realiza de acuerdo con el siguiente esquema:



De esta forma se obtienen los esteres metílicos de los ácidos grasos del conjunto de los lípidos totales o de cualquier fracción lipídica.

Las muestras de esteres metílicos se purifican por cromatografía en capa fina (es absolutamente necesaria la purificación cuando se ha utilizado BHT como antioxidante en la extracción de lípidos), sobre placas de Silicagel G, 20x10 cm. y 500 μ de espesor que se desarrollan en el sistema n-hexano/éter (98,5:1,5 V/V). Las bandas se localizan por pulverización de las placas con Rodamina 6G al 0,1% en metanol y examen bajo luz ultravioleta. La banda correspondiente a los esteres metílicos, que aparece justo encima del origen, se raspa y transfiere a un tubo y se extrae con n-hexano siguiendo el esquema de extracción de esteres metílicos.

El análisis de los mismos (disueltos en un pequeño volumen de hexano), se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard, modelo 5750, equipado con un detector de ionización de llama y columnas de acero inoxidable, de 6 pies de longitud y 0,25 mm. de diámetro interno, rellenas de polisuccinato al 20% sobre Cromosorb (80-100 mesh). Se operó a 180°C, siendo las temperaturas del detector e inyector de 250 y 300°C, respectivamente.

Las áreas de los picos se determinaron con un integrador - impresor Hewlett Packard, modelo 3370 A.

La identidad de los picos y validez cuantitativa de las concentraciones calculadas para los ácidos grasos, se establecen por comparación con patrones de esteres metílicos de los diferentes ácidos grasos.

Las figuras analíticas dadas en la representación gráfica de los resultados, son el valor medio de tres muestras iguales ($p < 0,01$). El grado de insaturación se calcula

en el apartado 2.4. se separan por cromatografía en capa fina, sobre placas de Silicagel G de 20x40 cm y 1.000 μ de espesor. Se aplican sobre la placa 100 mg de lípidos totales en forma de banda continua y se desarrollan en n-hexano/éter/acético (70:30:1, V/V/V). La banda de triglicéridos se localizó mediante pulverización de las placas con Rodamina 6G (0,1% metanol) y observación bajo luz ultravioleta. La banda correspondiente a dichas especies lipídicas se raspa de la placa y se transfiere a tubos de vidrio (boca esmerilada, B-29), procediéndose a continuación a la elución del ácido silícico, por sucesivas extracciones con cloroformo puro. Las fases clorofórmicas reunidas se evaporan a sequedad.

La hidrólisis de los triglicéridos, que permite estudiar la distribución parcial de ácidos grasos, se llevó a cabo de la siguiente manera: a 10 ml de triglicéridos puros se añaden 0,25 ml de solución de CaCl_2 al 22% (p/v); 0,35 ml de desoxicolato sódico al 0,1% (p/v) y 4,0 ml de tampón tris 1 M, pH 8,0. Esta mezcla, previamente sonificada, se incuba con lipasa pancreática (19 mg, previamente lavados con acetona fría), a 40°C, durante 10 minutos. La reacción se detiene por adición de HCl 6N (0,7 ml), y los productos de hidrólisis se obtienen mediante tres extracciones sucesivas con 20 ml de éter. Las fases etéreas reunidas se secan sobre Na_2SO_4 anhidro; a continuación se filtra y evapora a sequedad en evaporador rotatorio.

Los productos de hidrólisis se separan por cromatografía en capa fina, sobre placas de Silicagel G de 500 μ de espesor y de 20x20 cm; el sistema de disolventes empleado es n-hexano/éter/acético (70:30:1, V/V/V). La detección de los ácidos grasos libres (posiciones 1+3) y monoglicéridos (posición 2) se realiza por pulverización de las placas con Rodamina 6G (0,1% en metanol) y observación bajo luz ultravioleta. Las bandas correspondientes a mencionadas posiciones son transferidas a tubos de metanol-

sis, procediéndose al análisis de los esteres metílicos correspondientes, según la metodología descrita en el apartado 2.5.

2.8. METODOS DE ANALISIS ENZIMATICOS.

La extracción de los tejidos en los que se van a realizar medidas de actividad enzimática se realiza de la misma forma a la descrita en el primer párrafo del apartado 2.4., con la única diferencia de que, en este caso, no son introducidos en aire líquido, sinó que, inmediatamente después de ser extraídos de los animales, se procede a su utilización.

2.8.1. ANALISIS DE LA ACTIVIDAD ACETIL- CoA CARBOXILASA DE HIGADO.

Los hígados, una vez troceados se homogeneizan con 3 volúmenes (1 gr tejido = 1 volumen) de tampón tris, frío, 0,05 M, pH 7,4, utilizando un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio, con un émbolo de teflón. Los homogeneizados totales se filtran sobre gasa doble, centrifugan a 900 g. durante 10 minutos. Los sobrenadantes se utilizan en el estudio de la actividad enzimática. Todas las operaciones se llevaron a cabo entre 0-4°C. La determinación de las proteínas totales en los sobrenadantes se realizó por el método de Lowry y col. (1.951), que se describe en el apartado 2.9.

La actividad acetil-CoA carboxilasa se estudia mediante fijación de $^{14}\text{CO}_2$ procedente de $\text{NaH } ^{14}\text{CO}_3$ en un material ácido estable. La mezcla de incubación contiene (valores expresados como $\mu\text{moles por ml}$): tampón de fosfato potásico, pH 7,4, 22; mercaptoetanol, 2,5; bicarbonato potásico 10; acetil-CoA, 0,07, y cantidades variables de

cofactores, tales como citrato, NADPH, NADH y malonil-CoA. La preparación enzimática utilizada contiene 10 mg de proteína/ml y el volumen final de la incubación 0,5 ml, que fué mantenida a 37° C en una incubadora de agua. En todos los casos, la reacción se comienza por adición de bicarbonato sódico (2 μ Ci) y se detiene con 0,1 ml de HCl 6N; a continuación se agitan en mixer los tubos conteniendo las mezclas de incubación, se evaporan a sequedad a vacío y se mide, por centelleo, la radiactividad del residuo. Cada incubación se realiza siempre por duplicado.

2.8.2. ANALISIS DE LA ACTIVIDAD ACIDO GRASO-SINTETASA DE HIGADO.

La extracción de los tejidos, así como la preparación de los homogeneizados correspondientes, se realiza de acuerdo con lo expuesto en los apartados 2.8 y 2.8.1.

La biosíntesis de ácidos grasos se estudió mediante incorporación de acetil-CoA ($1\text{-}^{14}\text{C}$) en los ácidos grasos.

La mezcla de incubación contiene (valores expresados como μ moles/ml): ($1\text{-}^{14}\text{C}$)-acetil-CoA, 0,065; mercaptoetanol 2,5; bicarbonato potásico, 10; citrato sódico 3; tampón fosfato potásico, pH 7,4, 22 y cantidades variables de cofactores. La preparación enzimática contiene 10 ng de proteína/ml y volumen final de cada incubación es de 0,5 ml. realizándose ésta a 37° C durante 30 minutos, en incubadora de agua. La reacción se detiene por adición de 2 ml de cloroformo procediéndose, seguidamente, a la extracción de los lípidos, según el método de Bligh y col (1.959), siendo medida después la incorporación de radiactividad en lípidos, por contaje por centelleo líquido.

Los resultados en ambas determinaciones enzimáticas se dan como valores medios de los obtenidos en el con

junto de animales utilizados en cada caso ($P < 0,05$).

Como se ha mencionado, la radiactividad total incorporada en los lípidos totales y en cada una de las clases principales, se determina por centelleo líquido. Se han utilizado dos sistemas de centelleo; el primero, formado por una mezcla de PPO (2,5 difeniloxazol), 4 gr; POPOP (1,4-bis 2-(5-feniloxazolil) benceno), 100 mg, en un litro de tolueno, para medir la actividad de los extractos de lípidos totales o de aquellas fracciones que no contengan Silicagel. El segundo sistema permite medir la radiactividad en las muestras que contienen Silicagel y está formado por PPO (1,5 gr), POPOP (0,45 gr), naftaleno (150 gr) dioxano (hasta 1.500 ml de disolución) y agua (hasta completar 1.800 ml). En todos los casos, el volumen de líquido de centelleo utilizado para el conteo (en viales), ha sido de 10 ml.

Las medidas de radiactividad se efectúan en un espectrómetro de baja temperatura UNILUX II, Nuclear Chicago. Las condiciones de conteo, para máxima eficacia se han fijado en L-U 0,1 a 9,9 de discriminación y D 500 para la atenuación, con un tiempo de conteo de 10 minutos. La eficacia del conteo se mantiene alrededor del 70%.

2.8.3. ACTIVIDAD ADENIL-CICLASA DE TEJIDOS.

De las conejas adultas (control y gestante) se extraen el hígado y tejido adiposo intestinal. De todos los fetos se extraen la placenta y el hígado, formando un "pool" con estos órganos procedentes de todos los fetos de la misma madre.

En todos los casos, los tejidos son troceados y lavados con una disolución de NaCl 0,85%; en el caso de la placenta se ha tenido especial cuidado en la eliminación

de membranas y vasos sanguíneos. A continuación, los teji dos previamente pesados son homogeneizados en un Potter-Elvehjem de vidrio con émbolo de teflón bien ajustado, uti lizando el volumen necesario de disolución de sacarosa 0,25 M para obtener en cada caso la adecuada concentra- ción de proteínas en el homogeneizado. Tanto la homoge- neización como las operaciones previas de preparación de de los tejidos se realizan a 0-4°C y el tiempo transcurri- do entre la extracción de los tejidos y la incubación de los homogeneizados es de 30 minutos.

Los homogeneizados brutos se filtran por dos capas de gasa a tubos de centrifuga de plástico, con lo cual se eliminan los restos groseros no homogeneizados. Estos homogeneizados filtrados se centrifugan una vez a 600xg durante 10 minutos en una centrifuga Sorvall refrigerada entre 0-2°C, eliminando así células intactas y núcleos. El sobrenadante se recoge con una jeringa de plástico pro vista de aguja de acero inoxidable con el fin de evitar la capa de grasa que se obtiene en la parte superior de los tubos de centrifuga. Este sobrenadante constituye el PRE- PARADO ENZIMATICO TOTAL utilizado en nuestros ensayos de actividad enzimática.

En cada experiencia se utilizan grupos de 4 anima- les de las mismas características, por lo que cada resul- tado obtenido representa el valor medio de cuatro determi- naciones individuales.

2.8.3.1. MEDIOS DE INCUBACION.

Los medios de incubación varían según las experien- cias y se detallarán para cada una en concreto al descri- bir los resultados obtenidos. En este apartado se indican solamente los componentes del medio de incubación así co- mo las ideas básicas que han determinado su utilización.

Este método experimental para la determinación de la actividad de adenil ciclasa está basado en el aislamiento y determinación cuantitativa del AMP cíclico radiactivo formado a partir de su precursor (ATP) radiactivamente marcado presente en el medio de incubación. El precursor radiactivo utilizado fué ATP- α - ^{32}P que en esta reacción enzimática origina AMP-3':5'- ^{32}P cuya actividad se determina por conteo en centelleo líquido. En la ejecución experimental de este procedimiento es necesario resolver estos problemas fundamentales: (1) mantener la concentración de sustrato (ATP) suficiente para obtener velocidades máximas continuas de formación AMP cíclico; (2) inhibición de la hidrólisis del AMP cíclico debida a las fosfodiesterasas presentes en el preparado enzimático utilizado; y (3) identificación y determinación cuantitativa del AMP cíclico formado; este último aspecto será tratado en una sección posterior.

1. Mantenimiento de la concentración de sustrato.

Ya que los sistemas de membranas que contienen adenil ciclasa poseen también ATPasas cuya actividad es mucho mayor que la de adenil ciclasa, es difícil mantener en el medio de incubación concentraciones de ATP para obtener velocidades máximas de formación de AMP cíclico. Una forma de conseguir esto sería añadir concentraciones elevadas de ATP (3 mM o mayores) al medio de incubación. Pero esto, además de aumentar la dilución isotópica del sustrato obligando así a utilizar una cantidad mayor de precursor radiactivo, tiene el inconveniente de que el ATP presente en elevadas concentraciones además de actuar como sustrato tiene otros efectos, pudiendo alterar la respuesta del sistema a la acción hormonal. La solución a la que se recurre más frecuentemente es la utilización de sistemas regeneradores de ATP, siendo los más utilizados los sistemas fosfocreatina- creatina quinasa y fosfoenolpirúvico- pirúvico quinasa.

En nuestros ensayos hemos utilizado este último sistema, constituido por fosfoenolpirúvico 6mM y pirúvico quinasa 50 µg/ml.

2. Inhibición de la hidrólisis del AMP cíclico.

La acción de las fosfodiesterasas se inhibe por metil xantinas (Butcher y Sutherland, 1.962). Por otra parte, ya que lo que se mide es la formación de AMP cíclico radiactivo, se puede añadir al medio de incubación AMP cíclico no marcado, con lo cual, por un efecto de dilución isotópica, se disminuye la hidrólisis del AMP cíclico radiactivo; la validez de este procedimiento está justificada porque el AMP cíclico, incluso a concentraciones elevadas, no inhibe la adenil ciclase (Birnbaumer et al., 1.969).

En nuestros ensayos hemos combinado ambos efectos, añadiendo al medio de incubación cafeína 8 mM y AMP cíclico no marcado 2 mM.

Por otra parte, hemos comprobado experimentalmente que en nuestro sistema de incubación la recuperación de AMP cíclico radiactivo es prácticamente el 100% indicando que la efectividad del sistema inhibidor de la hidrólisis del AMP cíclico radiactivo es muy elevada.

Aunque, como se señaló al principio, el medio de incubación varía según las experiencias, en la mayor parte de los ensayos se ha utilizado un medio de incubación básico, al cual corresponde lo que en los resultados se denomina "actividad basal" de adenil ciclase; la composición de este medio de incubación es la siguiente:

Tampón Tris - ClH, pH 7,5, 40 mM

ATP, sal disódica, 0,4 mM (1,5 µ Ci/incub. de ATP-³²P)

Fosfoenolpirúvico, sal trisódica, 6 mM

Pirúvico quinasa, 50 μ g/ml
 MgCl₂ , 5 mM
 Cafeína, 8 mM
 AMP cíclico no marcado, 2 mM

Las modificaciones en el medio de incubación se realizan sobre la base del anteriormente descrito y se refieren fundamentalmente a la presencia de ion F⁻ (actividad estimulada por fluoruro) y concentraciones variables de ATP y Mg⁺² (dependencia de la actividad de adenil ciclasa con la concentración de sustrato).

El volumen final de cada incubación es de 0,2 ml. Las disoluciones de todos los cofactores se preparan en el acto disolviéndose en tampón Tris - HCl 80 mM en las concentraciones adecuadas para obtener en el medio de incubación final la concentración requerida de cada uno de ellos. La preparación del medio de incubación se hace de modo que el volumen total de las disoluciones de todos los cofactores sea 0,1 ml, añadiendo a continuación 0,1 ml del preparado enzimático convenientemente diluido para tener la concentración de proteínas requerida.

2.8.3.2. INCUBACION.

Las incubaciones se realizan en tubos de centrifuga de vidrio de 2,5 cm³ de capacidad. A cada uno de los tubos, introducidos en un baño de hielo, se adicionan las disoluciones de los cofactores (0,1 ml de volumen total) y a continuación se añade el preparado enzimático (0,1ml). La incubación de la mezcla se realiza a 30° C durante 10 minutos en una incubadora de agua provista de agitación mecánica. Transcurrido este tiempo se detiene la reacción introduciendo los tubos en un baño de agua hirviendo durante 3 minutos.

El tiempo de incubación de 10 minutos se ha elegido

después de comprobar experimentalmente que la formación de AMP cíclico en las condiciones experimentales utilizadas variaba de forma lineal con el tiempo de incubación durante los 15 minutos iniciales de la reacción..

Todas las reacciones se realizan por triplicado.

2.8.3.3. SEPARACION CROMATOGRAFICA Y CONTAJE DEL AMP CICLICO.

Después de detener la reacción enzimática, los tubos de incubación se centrifugan a 9000xg durante 5 minutos con lo cual se precipitan las proteínas desnaturalizadas. 50 ml del sobrenadante claro se aplican en papel Whatman 3MM formando una banda de 3 cm; por cada incubación se hacen dos aplicaciones idénticas. En cada cromatograma, junto con las aplicaciones problema, se pone un punto testigo que contiene 0,05 μ mol de AMP cíclico. Los cromatogramas se desarrollan en cromatografía descendente durante 18 horas a 27°C en un sistema ACETATO AMONICO 1M-ETANOL 95% (3:7). Después de secar completamente los papeles se revelan bajo luz U V (260 nm) y con un lápiz se marcan las áreas correspondientes a las bandas de AMP cíclico; estas bandas se recortan y se introducen directamente en viales de vidrio para conteo en centelleo líquido con 15 ml de líquido de centelleo de tolueno (PPO, 4g., POPOP, 40 mg; tolueno, 1 litro).

Las medidas de radiactividad se llevan a cabo en un contador de centelleo líquido de baja temperatura UNILUX II, Nuclear Chicago. Las condiciones del aparato para una máxima eficacia se han fijado en L-U 0,0 a 9,9 para el discriminador y G 800 de atenuación.

En todas las experiencias se realizan ensayos control; estas incubaciones contienen todos los reactivos y el preparado enzimático, excepto ATP; se introducen 3 mi-

nutos en agua hirviendo, se añade ATP en cantidad y actividad idénticas a las de las incubaciones problema y se introducen de nuevo en agua hirviendo durante 3 minutos.

La cantidad de AMP-3':5'- ^{32}P formada se calcula a partir de la actividad específica del ATP utilizado como sustrato. Las cuentas obtenidas se corrigen teniendo en cuenta la radiactividad obtenida en el área de AMP cíclico en los ensayos control. Los resultados se expresan teniendo en cuenta el "quenching" y la eficiencia del conteo.

Se han realizado estudios previos (que se detallan más adelante en los resultados), de la formación de AMP cíclico en función de la concentración de proteínas en el medio de incubación; de este modo se han determinado los intervalos de concentración de proteínas en que dicha variación es lineal en cada uno de los tejidos estudiados y dentro de estos intervalos se encuentran los preparados enzimáticos ensayados para determinar la actividad de adenil ciclasa en los diferentes tejidos.

Todas las medidas de actividades enzimáticas se realizan utilizando reactivos de elevado grado de pureza (Sigma; Merck).

2.9. VALORACION DE PROTEINAS

En todos los ensayos realizados se lleva a cabo la valoración de proteínas en el preparado enzimático total a fin de calcular actividades enzimáticas específicas y hacer comparables los resultados obtenidos. La valoración de proteínas se realiza por el método de Lowry et al., (1.951), del siguiente modo:

Reactivos

Reactivo Folin-Ciocalteu diluido: 1 vol. de reactivo Folin-Ciocalteu (Merck) + 2 vol. de agua destilada

Reactivo A: CO_3Na_2 al 2% en NaOH 0,1 N

Reactivo B: $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0,5% en tartrato sódico al 1%.

Procedimiento

En el momento de realizar la valoración se prepara una mezcla de los reactivos A y B en la proporción 50 vol. de A + 1 vol. de B; se pone en cada tubo de ensayo 5 ml de esta mezcla y se añade a cada uno de ellos 1 ml de la disolución problema, cuyo contenido en proteínas esté comprendido entre 150 y 800 $\mu\text{g/ml}$. Es necesario, por tanto, efectuar las disoluciones adecuadas del preparado enzimático, de modo que la concentración de proteína se encuentre entre los límites citados. La mezcla después de agitar, se deja a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se añade a cada tubo 0,5 ml del reactivo Folin diluido. La mezcla se deja 40 minutos a temperatura ambiente con agitación periódica, apareciendo en los tubos una coloración azul cuya absorbancia se mide a 500 $\text{m}\mu$ frente a un blanco constituido por una mezcla preparada según se ha descrito anteriormente, sustituyendo la disolución problema por 1 ml de agua destilada.

La concentración de proteínas en el problema se deduce a partir de una curva patrón construida con los datos de absorbancia obtenidos con diferentes disoluciones de albúmina de concentración conocida. Esta curva patrón se construye para cada valoración de proteínas. Para la preparación de estas disoluciones patrón se ha utilizado en todos los casos albúmina cristalizada de suero de bovino (Signa).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. EFECTO DE LA GESTACION Y ADMINISTRACION DE INSULINA SOBRE LOS NIVELES DE LIPIDOS EN SUERO DE CONEJO.

En esta experiencia se utilizan cuatro series de conejas con un tratamiento diferente en cada serie. A lo largo de la experiencia se hacen catorce tomas de sangre a cada animal y en cada una de ellas se realizan análisis de ácidos grasos libres, triglicéridos, colesterol total, fosfolípidos totales, clases de fosfolípidos y lipoproteínas. Las cuatro series de conejas estudiadas son conejas control (A), conejas tratadas con insulina (B), conejas gestantes (C) y conejas gestantes tratadas con insulina (D). Las tomas de sangre se realizan cada tres días, y las muestras 1, 2 y 3 (figura 7-10) constituyen los correspondientes controles analíticos de cada serie de animales. Las muestras 4, 5 y 6 representan los datos analíticos de los animales que han recibido una dosis diaria de insulina (B y D) de 1,0 unidades, mientras que estas muestras son todavía datos control en la serie de animales A y C. Las muestras 7 a 14 en los animales gestantes (C y D) constituyen los datos analíticos que corresponden a los días 8 a 29 de gestación, siendo análisis control en la serie A y resultados obtenidos en el tratamiento con insulina en la serie B.

La figura 7 muestra los niveles de ácidos grasos libres obtenidos en las cuatro series de animales. Los valores de los animales control (A) son de 30 a 60 μ eq/100 ml, y estos niveles se incrementan notablemente durante la segunda parte de la gestación (C). El tratamiento con insulina provoca un ligero y casi constante descenso (B) que contrarresta la influencia de signo opuesto debido a la gestación entre los días 8 y 17 (D), aunque la clara tendencia a incrementar estos niveles se observa en la última semana de gestación.

En la figura 8 se expresan los niveles de triglicéridos en suero de las cuatro series de animales. Los valores de los animales control (A) van de 10 a 40 μ mol./100 ml y no se modifican por el tratamiento con insulina (B). Los niveles de triglicéridos se elevan bruscamente a partir de los días 14-17 de gestación, tanto en conejas gestantes (C) como en las conejas gestantes tratadas con insulina (D), mostrando en ambos casos un comportamiento muy similar.

En la figura 9 se representan las alteraciones en la concentración de colesterol total en suero en las cuatro series de animales. Los valores de los controles (A) oscilan entre 40-70 mg/100 ml y el tratamiento con insulina (B) no parecen ejercer un efecto significativo. La gestación provoca un descenso claro y notable tanto en los animales gestantes (C) como en los gestantes que han recibido la dosis diaria de insulina (D).

Los efectos de la gestación (C) o del tratamiento con insulina (B), así como su influencia simultánea (D) sobre la concentración de fosfolípidos totales en suero se expresan en la figura 10. Los animales control (A) poseen concentraciones uniformes de fosfolípidos que se mantienen entre 20-30 μ g P/ml; estos niveles no se alteran significativamente por la administración de insulina. Sin embargo, la gestación provoca un notable descenso de los fosfolípidos totales hasta valores del orden de 5 μ g P/ml, incluso en los animales que han sido tratados con insulina (D).

Los fosfolípidos totales se fraccionaron en sus principales clases: fosfatidilcolina y su lisoderivado, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y esfingomielinas, y se determinaron sus niveles coincidiendo con los días 9, 14, 19, 24 y 29 de gestación en las condiciones experi-

mentales C y D . La observación de la figura 11 muestra un descenso claro y general en todas las clases de fosfolípidos durante la segunda mitad de la gestación; esta disminución se hace muy evidente a partir del día 9 de gestación (C y D) y afecta principalmente a los niveles de fosfatidilcolina; los datos analíticos correspondientes a los animales control (A) fueron prácticamente constantes durante el tiempo de la experiencia. La figura 11 muestra también las concentraciones de fosfolípidos en suero de fetos cuyas madres son gestantes normales (C) o han sido tratadas con insulina (D). Los niveles en suero fetal fueron extraordinariamente diferentes de los de sus madres respectivas, siendo los aspectos más destacados los elevados niveles de fosfatidilcolinas y esfingomielinas en suero fetal.

La figura 12 muestra la distribución de lipoproteínas de suero en las cuatro series de conejas. En los experimentos C y D, estos análisis fueron realizados coincidiendo con los días 9, 14, 17, 20, 24, y 29 de gestación. Los diagramas A representan las concentraciones relativas de las tres familias de lipoproteínas en los animales control y los diagramas D representan la influencia del tratamiento con insulina sobre dichas concentraciones. Estos diagramas muestran en conejas gestantes un desplazamiento significativo hacia un incremento relativo de las pre- β -lipoproteínas; este incremento fue por término medio de 20-30% en los días 26-29 de gestación (figura 12 C) y esta elevación fue acompañada en algunos de estos animales por una clara presencia de quilomicrones. Por otra parte, la administración de insulina durante un tiempo prolongado eleva claramente la relación entre los niveles de lipoproteínas α /pre- β (figura 12B). La distribución de lipoproteínas en los animales gestantes tratados con insulina (D) muestra predominio del efecto de la gestación, sobre todo durante su última semana, mientras que el efecto de la insulina parece predominar durante la primera etapa

de la gestación. Las lipoproteínas de suero fetal muestran una composición diferente de la del suero materno, caracterizada sobre todo por una elevada concentración de α -lipoproteínas.

En la bibliografía existente actualmente no están suficientemente explicados los cambios que la gestación provoca en los niveles de algunas de las fracciones de lipidos de suero, ni en lo que respecta al efecto cuantitativo sobre dichos niveles ni a sus causas. De la exposición anterior los resultados obtenidos se deduce que durante la gestación en conejos se produce un descenso en los niveles de colesterolyfosfolípidos, principalmente fosfatidilcolina, mientras que se elevan los niveles de ácidos grasos libres y de triglicéridos.

La hiperlipemia que afecta predominantemente a triglicéridos y a ácidos grasos libres se observa más claramente durante la segunda mitad de la gestación; los ácidos grasos libres se elevan de forma regular a lo largo de esta segunda mitad de la gestación, mientras que los triglicéridos muestran un máximo bastante pronunciado entre los días 14 y 26 de gestación, presentando además un pequeño incremento antes del término. Estos incrementos en las concentraciones de ácidos grasos libres y triglicéridos circulantes están asociados con los elevados niveles de pre- β -lipoproteínas y con la presencia de quilomicrones; la distribución de lipoproteínas se caracteriza además por una disminución de las lipoproteínas α y β . Así, se puede asociar el incremento en las pre- β -lipoproteínas en conejas gestantes con un incremento en la liberación de triglicéridos por el hígado, el cual puede tener su origen en una estimulación de la captura y utilización por el hígado de los ácidos grasos libres circulantes o en una estimulación de la propia síntesis de ácidos grasos. Ahora bien, la elevación simultánea de los niveles en plasma de

ácidos grasos libres y de triglicéridos sugiere que los ácidos grasos libres del plasma deben ser el factor principal que determina la elevación de los niveles de triglicéridos circulantes. Sin embargo, el diferente comportamiento de los niveles hiperlipémicos de triglicéridos y ácidos grasos libres durante la segunda mitad de la gestación, así como la falta de correlación entre los niveles de triglicéridos y la disminución de los ácidos grasos libres provocada por la administración de insulina durante un período de tiempo prolongado, sugieren que en las condiciones citadas esta hipótesis sencilla resulta insuficiente. Parece evidente, por tanto, que en el aumento de la secreción de triglicéridos por el hígado debe estar implicada también la regulación de la síntesis hepática de ácidos grasos.

La distribución cuantitativa de las lipoproteínas de suero de conejas gestantes se caracteriza también por una disminución significativa de los niveles de β -lipoproteínas que es concomitante con el descenso en las concentraciones de fosfolípidos y colesterol hasta valores muy bajos durante la última semana de gestación. Por otra parte, el desplazamiento hacia el predominio de las α -lipoproteínas observado en el plasma fetal en relación con el materno está de acuerdo con los mayores niveles de fosfolípidos, fundamentalmente fosfatidilcolina, presentes en el plasma de feto a término. Sin embargo, como ya se ha indicado en la primera parte de esta memoria, la mayor parte de los experimentos "in vivo" sugieren que para su síntesis de lípidos el feto depende de múltiples precursores maternos que o bien atraviesan directamente la placenta - colesterol, ácidos grasos libres, etc. - o bien son transformados en la placenta- fosfolípidos. Así, esta transferencia de lípidos maternos a los fetos puede ser responsable del descenso de ciertos lípidos de plasma que tiene lugar durante la gestación en conejos. A este respecto es interesante ci

tar que Zilversmit et al. (1.972), utilizando un detergente que bloquea la hidrólisis de los triglicéridos del plasma, han encontrado que la velocidad de secreción de colesterol al plasma en conejos gestantes era mayor que la observada en animales no gestantes. Ya que las β -lipoproteínas disminuyen fuertemente durante la gestación, una mayor utilización de colesterol y fosfolípidos por los tejidos extrahepáticos puede ser una de las causas que contribuyen a explicar los resultados obtenidos.

Para estudiar el posible papel de la insulina en la regulación de los triglicéridos circulantes así como los posibles efectos de una hiperinsulinemia en conejas gestantes y no gestantes, se ha llevado a cabo un estudio mediante la administración de insulina durante un período prolongado de tiempo a ambos tipos de animales. Se sabe actualmente que durante el desarrollo los órganos endocrinos del feto controlan su metabolismo lipídico y aunque los órganos endocrinos fetales producen hormonas de modo similar al adulto, su regulación en el útero puede ser muy diferente a la observada después del nacimiento. Por otra parte, la síntesis de lípidos es dependiente de la disponibilidad de glucosa y ácidos grasos en los tejidos, lo que da ideas sobre la importancia de este estudio acerca del papel de la insulina.

La administración de insulina "in vivo" durante un período prolongado de tiempo no produce ningún cambio significativo en los niveles de triglicéridos, colesterol y fosfolípidos en conejas normales no gestantes; sin embargo, se observa un ligero descenso en la concentración de ácidos grasos libres. Cuando se administra insulina a conejas gestantes, el descenso en los niveles de ácidos grasos que se observa inicialmente, se ve luego contrarrestado y superado por el efecto incrementador que sobre dichos niveles ejerce la gestación. La ausencia de una acción estimulante neta de la insulina sobre la lipogénesis hepática sugiere que su acción sobre los niveles de ácidos grasos libres del plasma se debe a su efecto antilipolítico sobre el

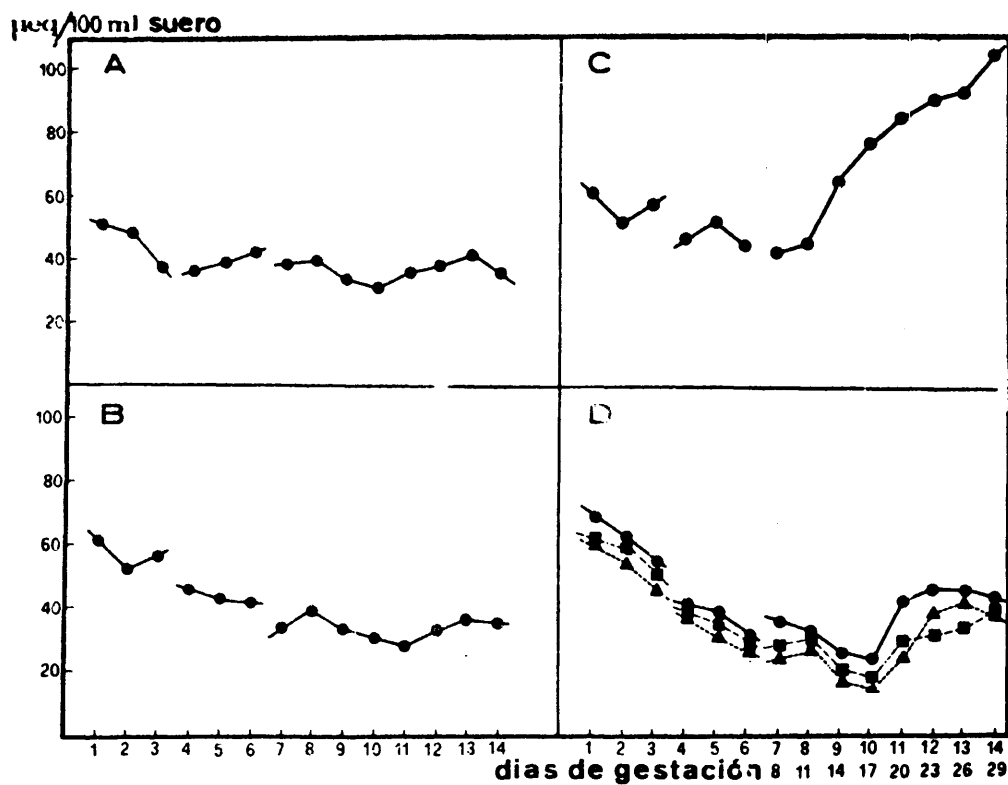


Fig. 7. Concentraciones de ácidos grasos libres en suero. A Animales control. B Animales tratados con insulina. C Animales gestantes. D Animales gestantes tratados con insulina. Cada línea representa el valor medio de un grupo de 4 animales.

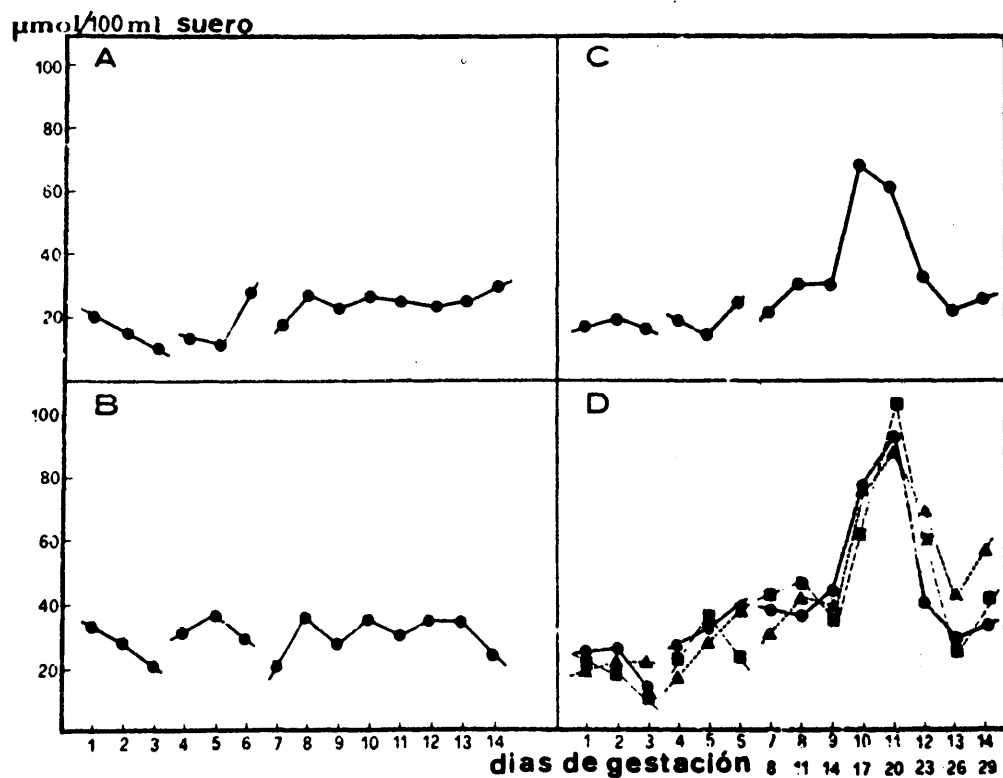


Fig. 8. Concentraciones de triglicéridos en suero. Explicaciones como en la figura 7.

mg/100ml suero

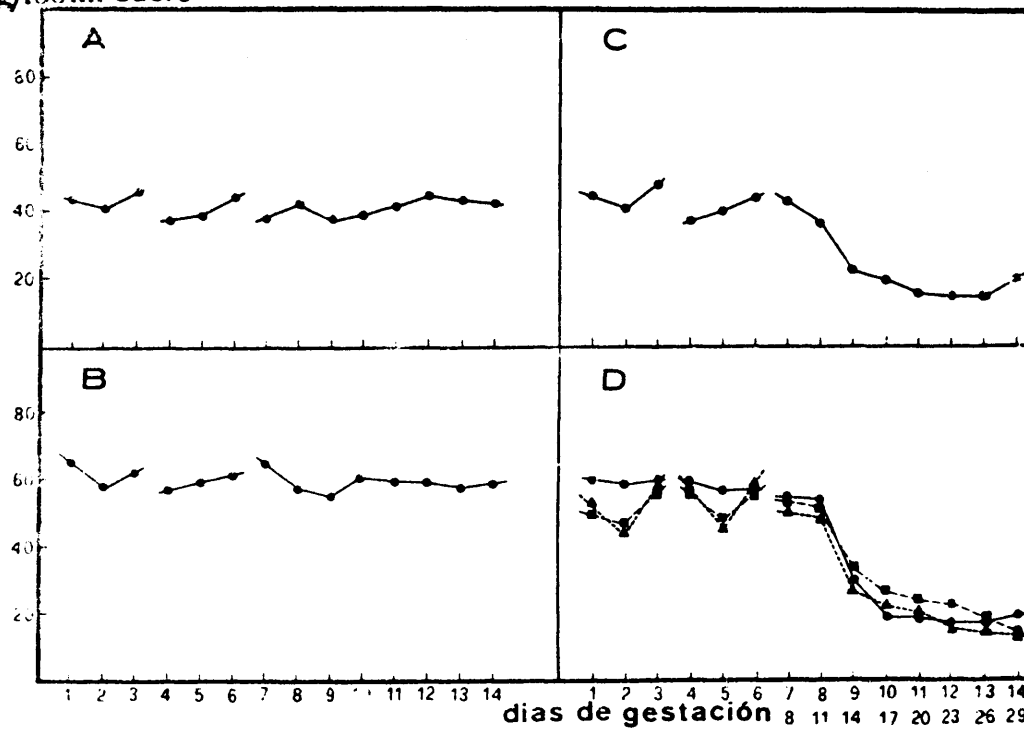


Fig. 9. Concentraciones de colesterol en suero. Explicaciones como en la figura 7.

µgP/ml suero

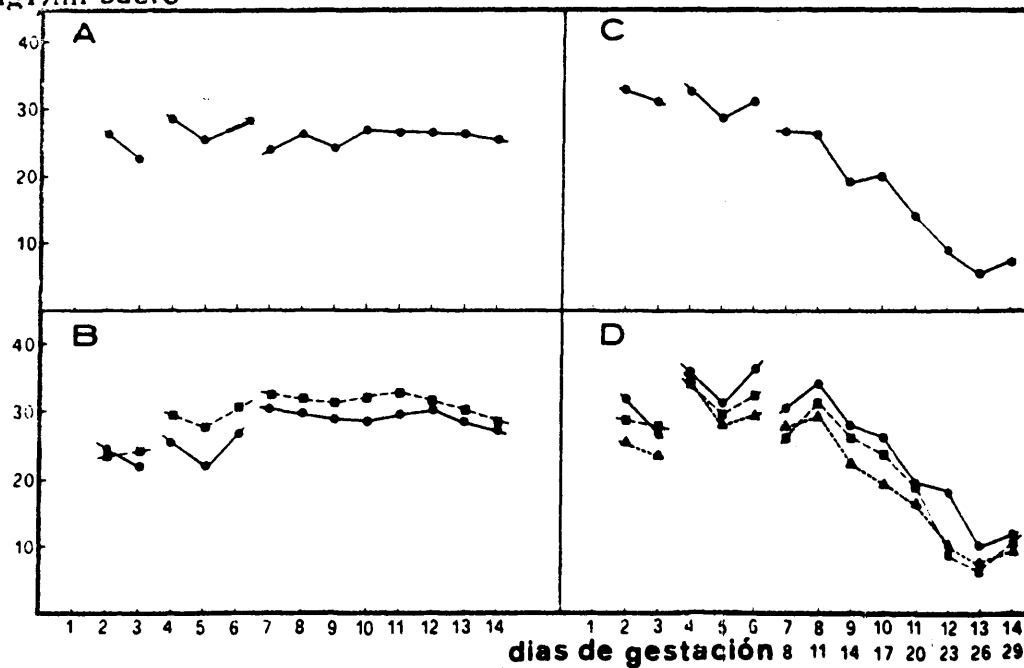


Fig. 10. Concentraciones de fosfolípidos totales en suero. Explicaciones como en la figura 7.

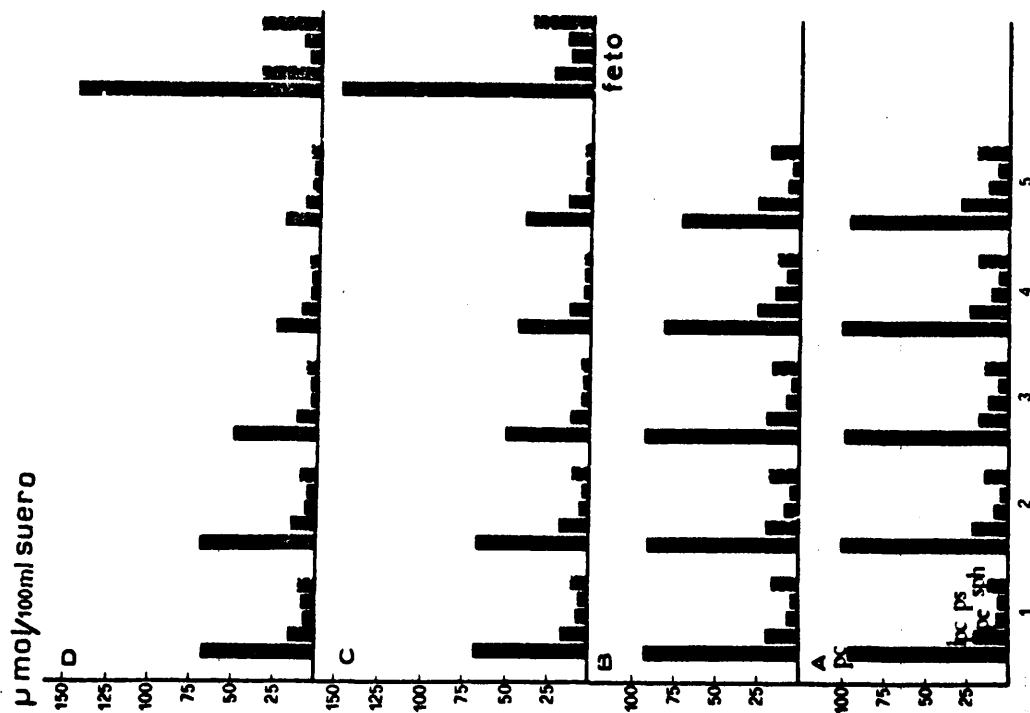


Fig. 11. Concentraciones de clases de fosfolípidos en suero. Explicaciones generales como en la figura 7. En las series A y B las muestras 1-5 corresponden a las tomas de sangre 8, 9, 11, 13, 14; en las series C y D las muestras 1-5 corresponden a los días de gestación 11, 14, 20, 26 y 29.

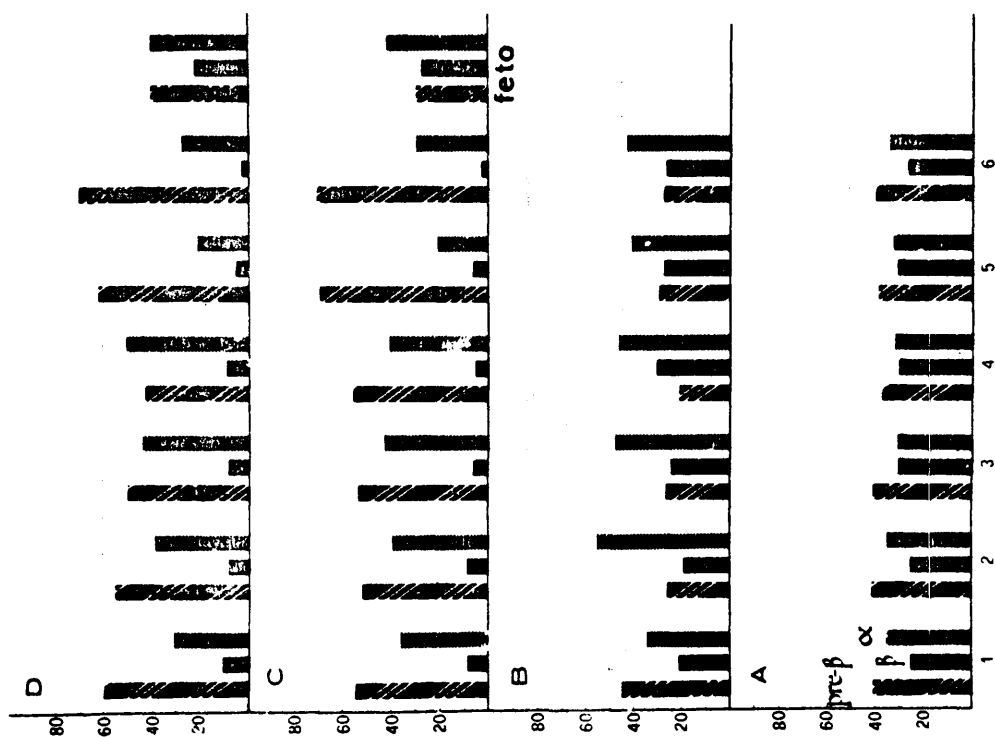


Fig. 12. Concentraciones relativas de lipoproteínas en suero. Explicaciones generales como en la figura 7. En las series A y B las muestras 1-6 corresponden a las tomas de sangre 8, 9, 10, 11, 13 y 14; en las series C y D las muestras 1-6 corresponden a los días de gestación 11, 14, 17, 20, 26 y 29.

tejido adiposo.

Como consecuencia de esta acción periférica de la insulina, la síntesis hepática de triglicéridos utilizaría las reducidas cantidades de precursores que llegan al hígado procedentes del plasma. Este proceso conduciría a un descenso en la formación de triglicéridos si no es compensado por un incremento en la lipogénesis hepática a partir de fuentes endógenas. Esta síntesis de triglicéridos a partir de precursores hepáticos endógenos puede superar cuantitativamente al flujo a partir de ácidos grasos libres del plasma, tal como ocurre en rata (Baker y Schotz, 1.967 Nikkilä, 1.966). Teniendo en cuenta los niveles de triglicéridos, este parece ser también el caso en conejos en condiciones de hiperinsulinemia. En cualquier caso, el ligero descenso de las pre- β -lipoproteínas que aparece durante la inyección de insulina parece indicar un posible descenso en la formación hepática de triglicéridos a partir de precursores exógenos. Finalmente, la administración de insulina a las conejas gestantes ni se opone ni elimina los elevados niveles de pre- β -lipoproteínas provocados por la gestación.

3.2. EFECTO DE LA GESTACION Y ADMINISTRACION DE INSULINA SOBRE LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE DIFERENTES CLASES DE LIPIDOS DE HIGADO EN CONEJOS.

En la figura 13 se expresa la composición de ácidos grasos de lípidos totales de hígado de conejas normales (13 A) y de hígado de animales gestantes (13 C), de conejas tratadas con insulina (13 B) y de animales gestantes tratados con insulina (13 D). Se observa claramente que la gestación modifica la composición normal de ácidos grasos de lípidos totales de hígado, siendo los cambios más

notables el incremento de ácido palmítico y el descenso de los ácidos esteárico y linoleico. La administración prolongada de insulina no provoca alteraciones en la composición de ácidos grasos totales, tanto en animales normales como en animales gestantes.

Los lípidos totales de hígado de los animales control se fraccionan en triglicéridos y fosfolípidos y se estudió la composición de ácidos grasos en ambas clases de lípidos. También se fraccionaron del mismo modo los lípidos totales de hígado procedentes de los animales gestantes y de los tratados con insulina.

En la figura 14 se muestra la composición de ácidos grasos de triglicéridos. La característica principal de los triglicéridos de hígado de los animales control (14 A) son los bajos niveles de ácido esteárico, mientras que los fosfolípidos correspondientes muestran elevados niveles de ácido linoleico. Los triglicéridos de hígado de coneja gestante (14 C) presentan niveles inferiores de ácido esteárico y superiores de ácido palmítico con respecto a los de los animales control. Parece por tanto que estos cambios en la composición de ambos ácidos grasos saturados de los triglicéridos de hígado de los animales gestantes son responsables de las variaciones de su concentración provocadas por la gestación en ácidos grasos totales.

La observación de la figura 15 muestra claramente que los fosfolípidos de hígado de conejas gestantes (15 C) presentan una composición de ácidos grasos caracterizada por bajos niveles de ácido linoleico. Así pues, parece claro que triglicéridos y fosfolípidos son responsables de los cambios en la composición de ácidos grasos de los lípidos totales de hígado provocados por la gestación; los triglicéridos son responsables de los cambios en la concentración relativa de los ácidos grasos saturados 16:0

y 18:0 , mientras que la disminución de ácido linoleico es debida a los fosfolípidos.

Todos estos cambios en la composición de ácidos grasos se reflejan claramente en los valores del grado de insaturación (tabla I). En primer lugar, resulta obvio que de cada grupo de animales los ácidos grasos de los triglicéridos son más saturados que los de los fosfolípidos. En segundo lugar, la gestación induce una variación en el grado de insaturación de los lípidos totales, incrementando la proporción de los ácidos más saturados. Esta disminución del grado de insaturación es debida a la contribución de triglicéridos más saturados.

TABLA I

Grado de insaturación de los ácidos grasos de lípidos totales, triglicéridos y fosfolípidos de hígado de los diferentes grupos de conejos.

	<u>lípidos</u> <u>totales</u>	<u>trigli-</u> <u>céridos</u>	<u>fosfo-</u> <u>lípidos</u>
Controles	1,05	0,76	1,16
Tratados con insulina	1,02	0,78	1,12
Gestantes	0,88	0,72	1,21
Fetos	0,79	0,81	0,67

También se ha estudiado la composición de ácidos grasos totales, de triglicéridos y de fosfolípidos en hígado de fetos a término. La figura 16 muestra la composición de ácidos grasos totales de hígado fetal (16 C_F) conparada con la del control adulto. Se observa que el hígado

fetal posee concentraciones superiores de los ácidos grasos monoinsaturados 16:1 y 18:1 , mientras que disminuye claramente el poliinsaturado 20:4; los niveles de ácido esteárico son significativamente más bajos que los del hígado materno. Estas concentraciones de ácidos grasos dan como resultado un valor del grado de insaturación de los lípidos totales del hígado fetal que es inferior al del hígado materno (tabla I).

Los lípidos fetales se fraccionaron también en triglicéridos y fosfolípidos y su composición se ha comparado también con la de los adultos control (A). Los valores relativos del grado de insaturación de ambas clases de lípidos de hígado fetal se expresan en la tabla I. El valor superior del grado de insaturación de los triglicéridos del hígado fetal es debido al descenso en la concentración de ácido palmítico con respecto a los triglicéridos maternos. Los ácidos grasos de los fosfolípidos fetales se caracterizan por su reducido grado de insaturación, notablemente inferior al de los fosfolípidos de las conejas control y gestantes, y es inferior incluso al de los triglicéridos del hígado fetal, lo cual constituye un aspecto interezante de los lípidos fetales. La composición porcentual de ácidos grasos de los fosfolípidos de hígado fetal (figura 18 C_f) se caracteriza sobre todo por los bajos niveles de los ácidos poliinsaturados 18:2 y 20:4 en relación a los fosfolípidos maternos.

Las comparaciones entre la composición de ácidos grasos de las clases de lípidos fetales (figuras 17 C_f y 18 C_f) y las de lípidos maternos (figuras 14 B y 15B) y lípidos de conejas control (figuras 14 A y 15 A) permiten deducir que la composición de ácidos grasos de los triglicéridos del hígado fetal (figura 17) es más similar a la del adulto normal que a la composición de los triglicéridos del hígado materno. Sin embargo, la composición de ácidos grasos de fosfolípidos del hígado fetal (figura 18)

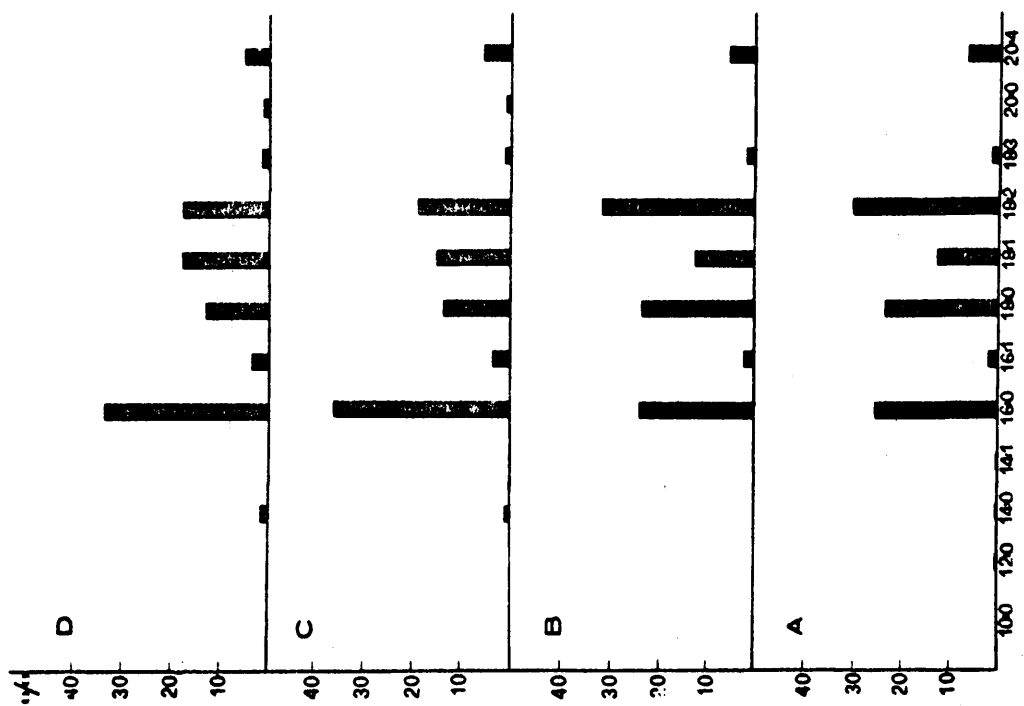


Fig. 13. Composición de ácidos grasos totales en hígado. A Animales control. B Animales tratados con insulina. C Animales gestantes. D Animales gestantes tratados con insulina.

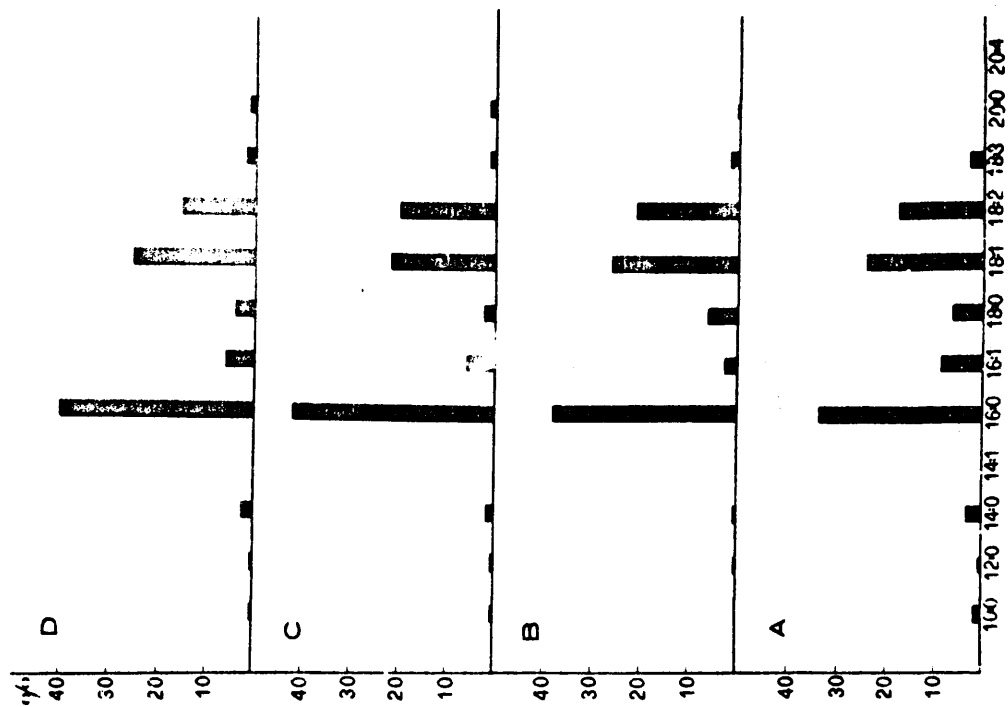


Fig. 14. Composición de ácidos grasos de triacilglicéridos de hígado. Explicaciones como en la figura 13.

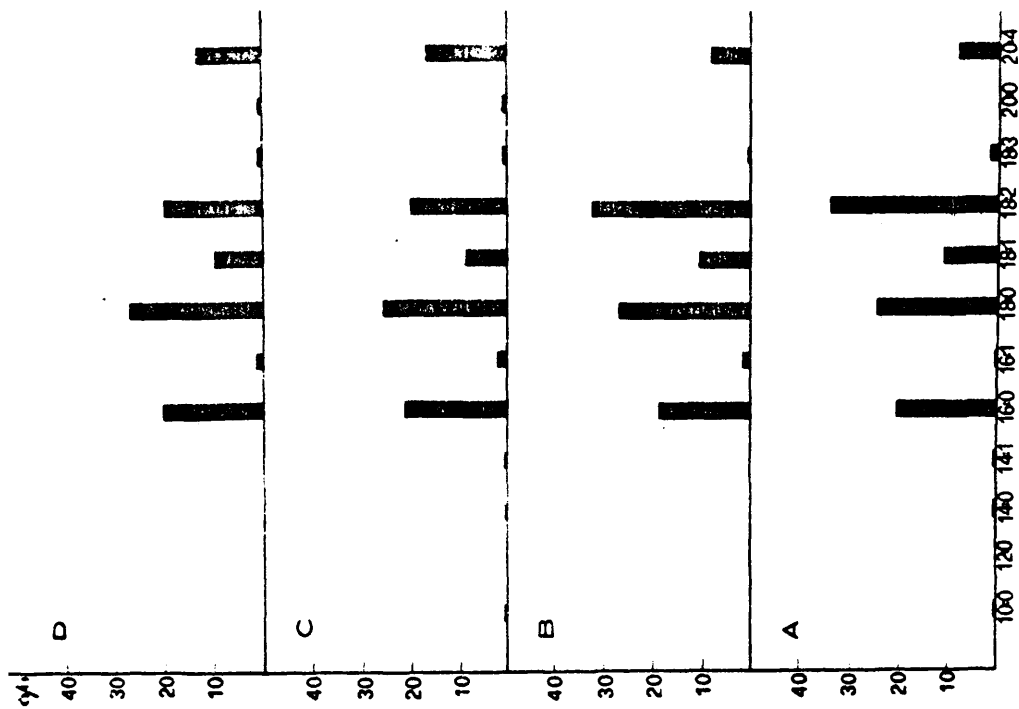


Fig. 15. Composición de ácidos grasos de gonolipídeos de hígado. Explicaciones como en la figura 13.

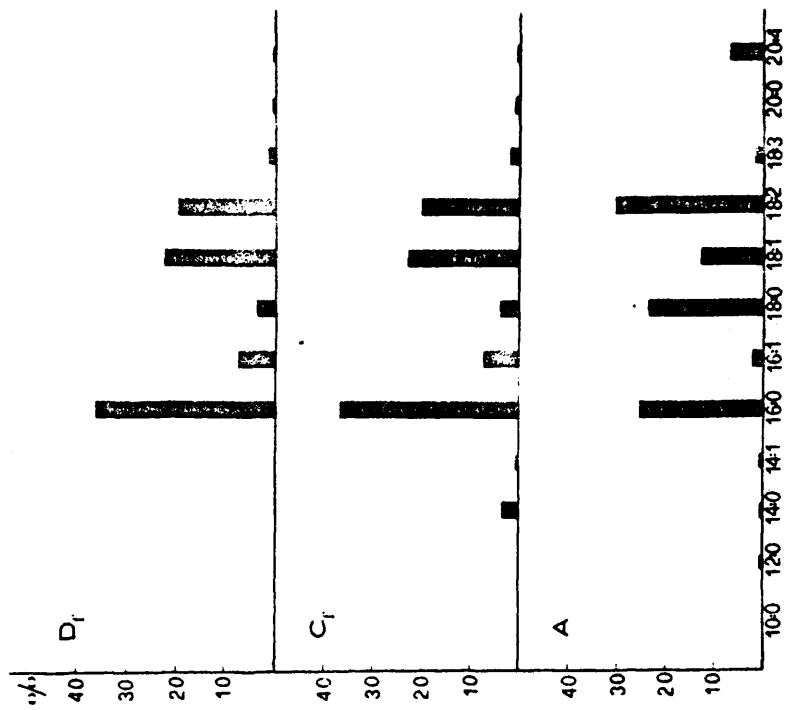


Fig. 16. Composición de ácidos grasos totales de hígado. A: Animales control. B: Hígado de fetos de animales gestantes con trol. C: Hígado de fetos de animales gestantes tratados con inulina.

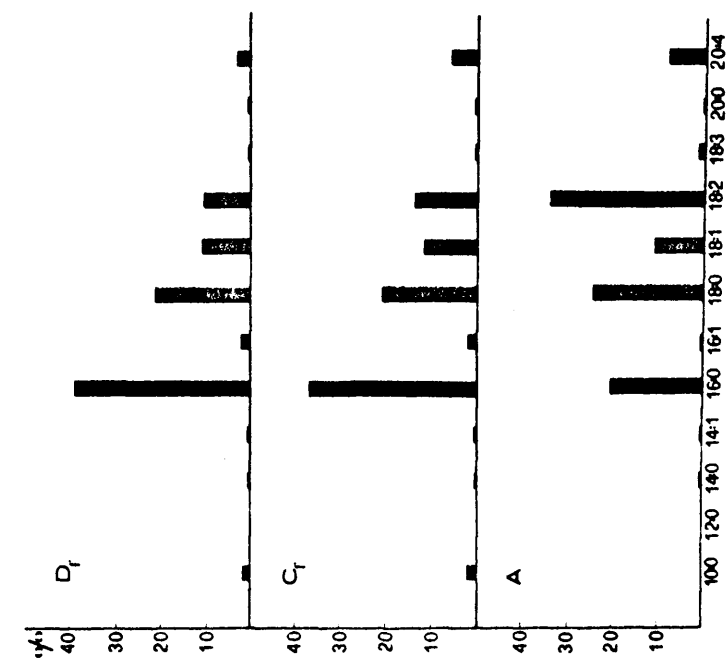


Fig. 17. Composición de ácidos grasos de triglicéridos de haddock. Explicaciones como en la figura 16.

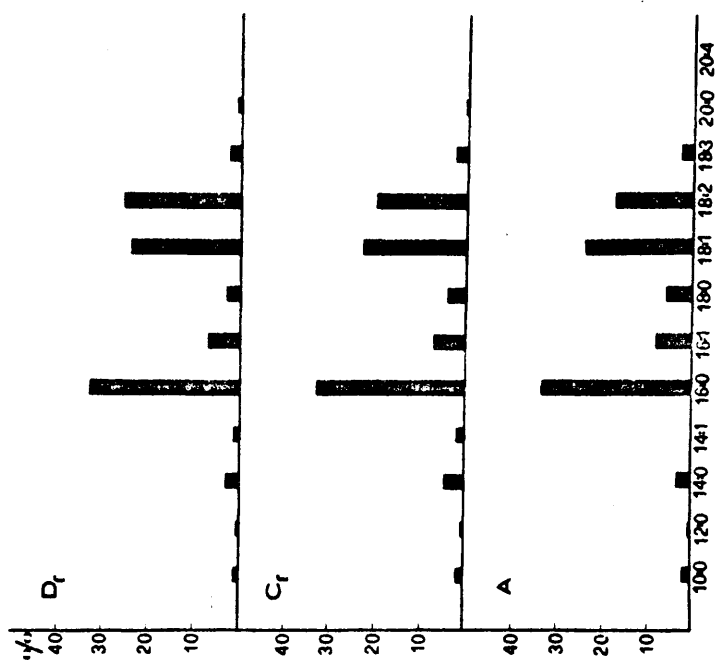


Fig. 18. Composición de ácidos grasos de fosfolípidos de haddock. Explicaciones como en la figura 16.

presenta marcadas diferencias con respecto a los fosfolípidos tanto de adultos control como gestantes; esta diferencia es debida al descenso en los porcentajes relativos de ácidos grasos insaturados que hace a los fosfolípidos fetales considerablemente más saturados que los maternos.

Se realizaron estudios similares en hígado de animales tratados con insulina y de animales gestantes tratados con insulina. Como ya se ha mencionado, la administración de insulina no modifica la composición de ácidos grasos totales (figura 13 B), y tampoco se observan cambios en la composición de ácidos grasos de triglicéridos (figura 14B) ni en la de fosfolípidos (figura 15 B). Por otra parte, el efecto que sobre la composición de ácidos grasos de lípidos totales y de las clases de lípidos ejerce la gestación no se altera prácticamente como consecuencia de la administración de insulina durante un período prolongado de tiempo (figuras 13 D, 14 D y 15 D).

La administración de insulina a las conejas gestantes tampoco influye sobre la composición de los lípidos de hígado fetal, ni en lípidos totales (figura 16 D_f) ni en las clases de lípidos (figuras 17 D_f y 18 D_f).

3.3. EFECTO DE LA GESTACION Y ADMINISTRACION DE INSULINA SOBRE LA DISTRIBUCION DE ACIDOS GRASOS EN FOSFATIDILCOLINA DE HIGADO Y PULMON MATERNOS Y FETALES EN CONEJOS.

La figura 19 muestra la distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de hígado de conejos adultos control (A) y gestantes (B). Las diferencias entre ambos concuerdan con los resultados anteriores referidos a la composición de ácidos grasos en fosfolípidos totales; así, los ácidos insaturados 18:2 y 20:4 son los responsables de

estas diferencias en fosfolípidos totales y en fosfatidilcolina de hígado. La distribución de ácidos grasos entre las posiciones 1 y 2 de la fosfatidilcolina de hígado no se afecta por la gestación.

La distribución de ácidos grasos entre las posiciones 1 y 2 de las fosfatidilcolinas aisladas de hígado de fetos se da en la figura 20. Estos resultados muestran que la relación de ácidos grasos saturados presentes en la posición 1 a los de la posición 2 es notablemente inferior a la misma relación existente en hígado materno (tabla II).

TABLA II

Relación entre las posiciones 1/2 de ácido palmítico

HIGADO			PULMON		
Control	Madre	Feto	Control	Madre	Feto
7.7	7.9	2.0	2.7	2.2	1.9

La administración de insulina durante un período de tiempo prolongado no modifica la distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina en hígado materno ni en hígado fetal.

La figura 21 muestra la distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de pulmón de conejos control (A) y gestantes (B). La figura 22 presenta la distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de pulmón fetal. Hay que destacar el hecho de que la abundante presencia de ácido palmítico en pulmón provoca que una gran proporción de es

te ácido esté localizada en la posición 2 de los fosfolípidos de pulmón materno y control; esto hace que la relación de ácido palmítico entre las posiciones 1/2 sea menor en pulmón que en hígado (tabla II).

Estos resultados están de acuerdo con el descubrimiento de Veryken et al (1.972) sobre los mecanismos que actúan en la biosíntesis de fosfatidilcolinas en hígado y pulmón de rata. Estos autores destacan la significativa incorporación de ácido palmítico en la posición 2 de 1-palmitoil-sn-glicero-3-fosforilcolina en presencia de microsomas de pulmón, en contraste con los microsomas de hígado que provocan sólo una muy limitada incorporación de ácido palmítico. Así pues, parece ~~ser que~~ en la formación de dipalmitoil-lecitina en pulmón desempeña un papel importante un mecanismo de desacilación-reacilación, mientras que en la formación de moléculas de lecitina que contienen ácido linoleico en hígado funciona primordialmente un mecanismo "de novo".

Los valores de la relación entre las posiciones 1/2 del ácido palmítico (tabla II) obtenidas en fosfatidilcolinas de hígado y pulmón de adulto control y adulto gestante están de acuerdo con aquellas observaciones; sin embargo, los valores de estas relaciones son prácticamente idénticos en fosfatidilcolina de hígado y pulmón de feto, siendo ambos muy similares a los del pulmón adulto. Es decir, está claro que la fosfatidilcolina de hígado fetal tiene una distribución de ácido palmítico muy similar a la del pulmón a término que todavía no respira. Este hecho está en la línea de los descritos por Gluck et al (1.970) según los cuales el feto de conejo a término almacena grandes cantidades de dipalmitoillecitina así como otras lecitin, incluyendo algunas especies moleculares que son liberadas a la superficie alveolar después del inicio de la respiración. Sin embargo, el determinar si un mecanismo

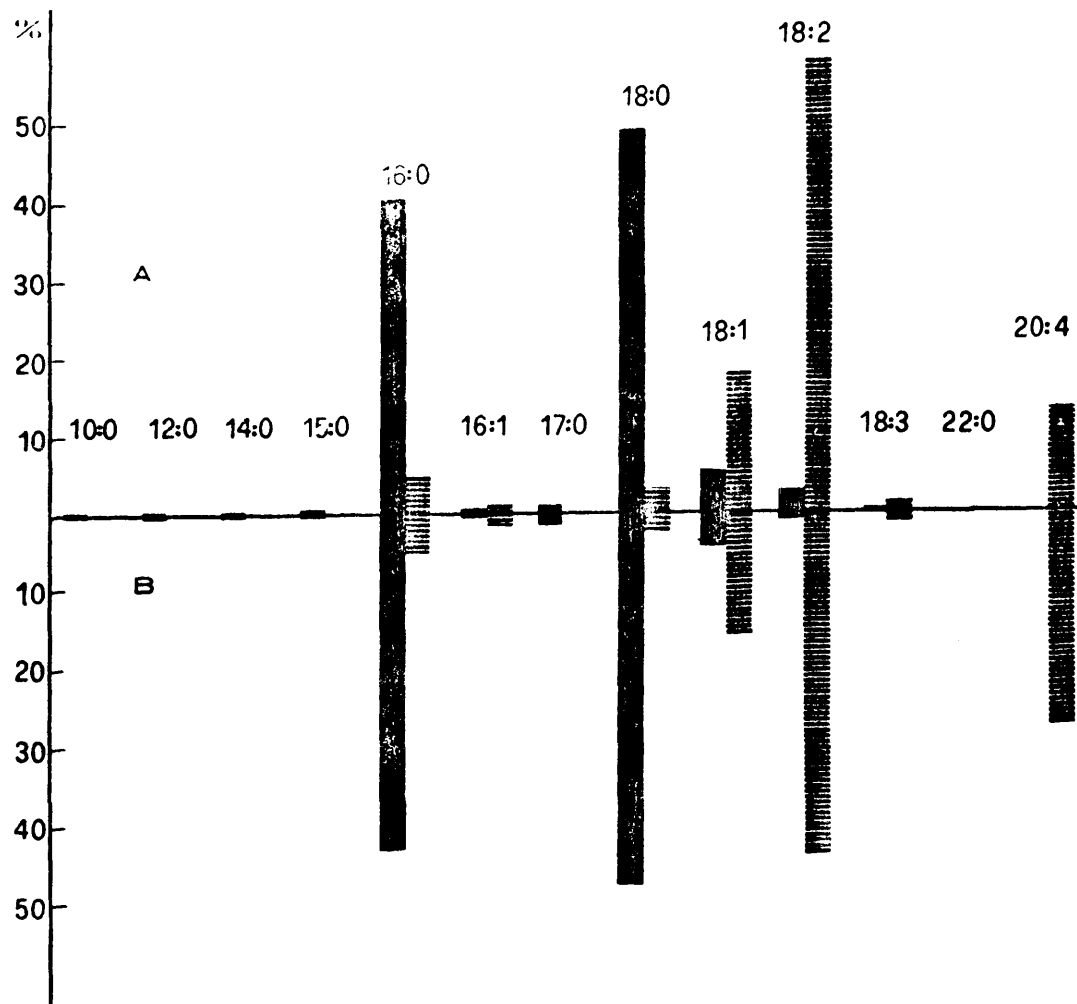


Fig. 19. Distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de hígado de conejas control (A) y gestantes (B). Barras negras = posición 1; barras rayadas = posición 2.

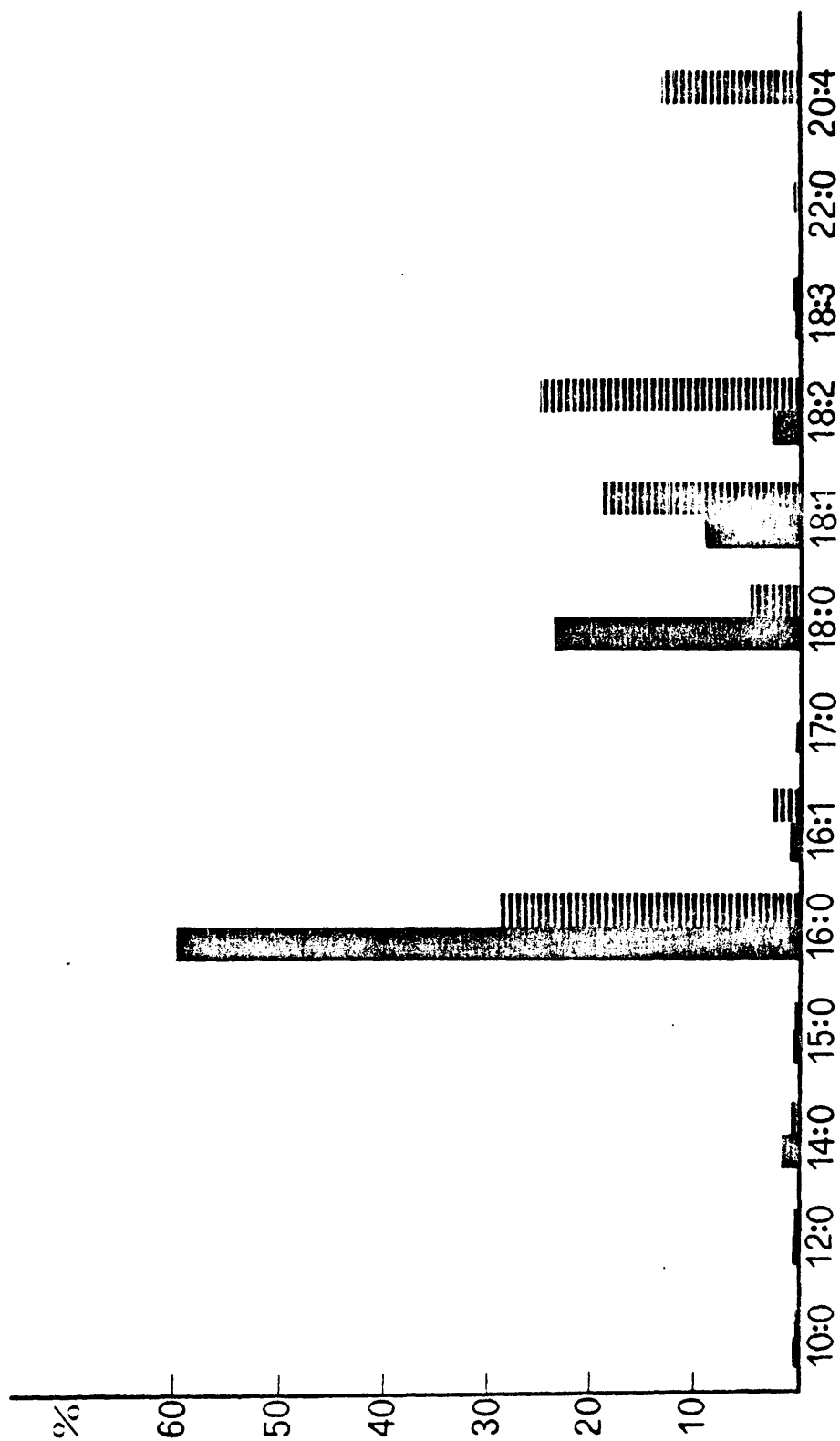


Fig. 20. Distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de hígado fetal. Símbolos como en la figura 19.

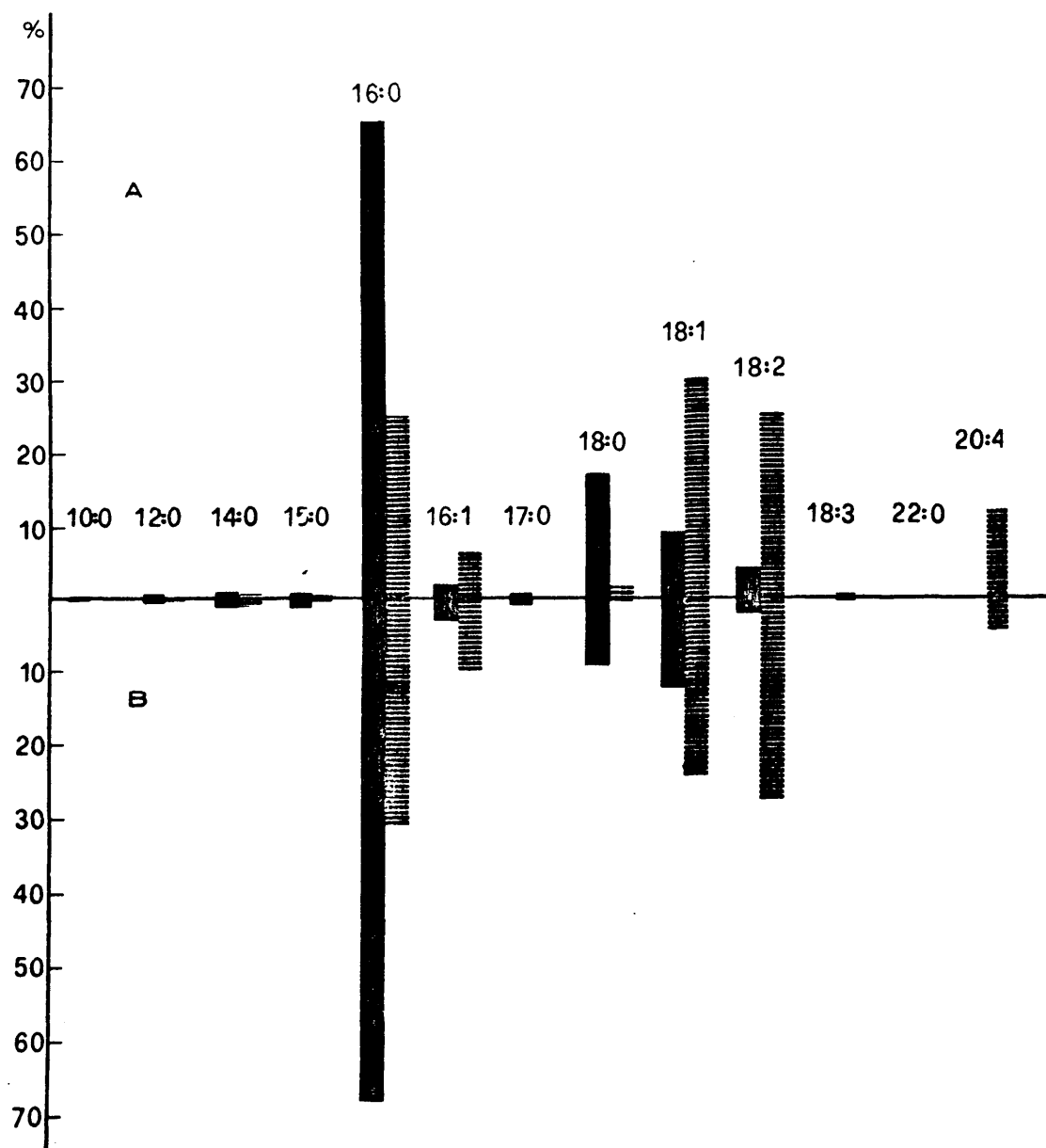


Fig. 21. Distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de pulmón de conejas control (A) y gestantes (B). Símbolos como en la figura 19.

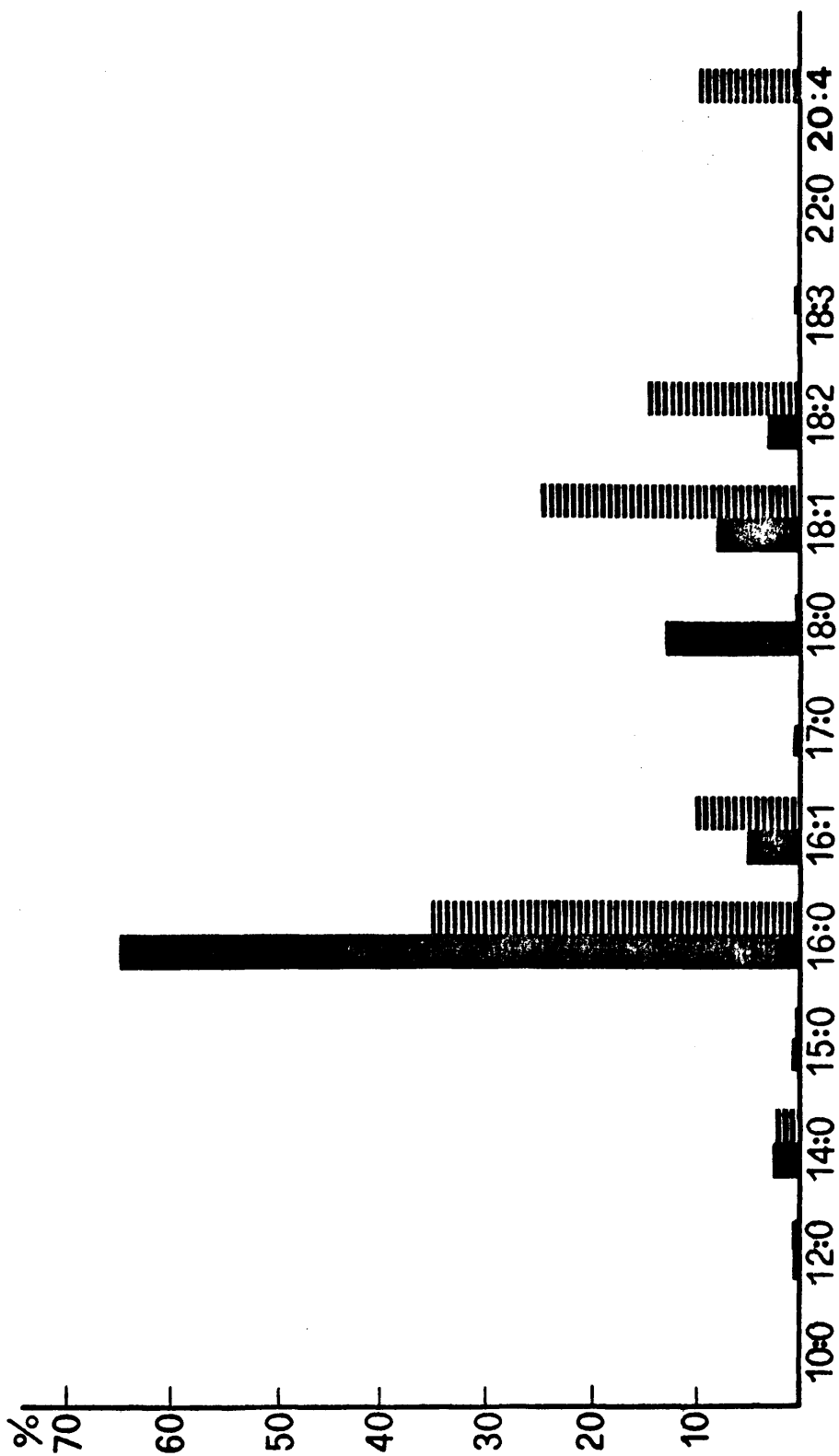


Fig. 22. Distribución de ácidos grasos en fosfatidilcolina de pulmón fetal. Símbolos como en la figura 19.

de desacilación-reacilación es importante en la síntesis de palmitoilecitas en hígado fetal es una cuestión que debe ser resuelta todavía.

3.4. INFLUENCIA DE LA GESTACION Y ADMINISTRACION DE INSULINA SOBRE LA DISTRIBUCION DE ACIDOS GRASOS EN FOSFATIDILETANOLAMINA DE HIGADO Y PULMON MATERNOS Y FETALES EN CONEJOS.

La figura 23 presenta la distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina de hígado de conejas control (A) y gestantes (B). Las diferencias en la composición de ácidos grasos totales entre ambos tipos de animales están de acuerdo con los resultados presentados anteriormente, relativos a la composición de fosfolípidos totales (sección 3.2.). Así, por ejemplo, la fuerte disminución de 18:2 debida a la gestación se refleja claramente en la composición de ácidos grasos de fosfatidiletanolamina que, por otra parte, muestra un incremento en el ácido graso poliinsaturado 20:4. Estas diferencias, sobre toda la menor proporción de 18:2 en hígado gestante, han sido observadadas también en fosfatidilcolina, según se ha señalado en la sección anterior.

La distribución cuantitativa de ácidos grasos entre las posiciones 1 y 2 de fosfatidilcolina de hígado no se afectaba por la gestación, pero sin embargo se observa una diferencia cuantitativa en esta relación en fosfatidiletanaminolamina; la gestación provoca un descenso de dicha relación tanto en los ácidos grasos saturados 16:0 y 18:0 como para los insaturados 18:1 y 18:2, debido respectivamente, a un incremento de sus proporciones en la posición 2 y a un descense de sus preporporciones en la posición 1.

La figura 24 muestra la distribución de ácidos grasos

sos en fosfatidiletanolamina de pulmón de conejas control (A) y gestantes (B). Esta distribución no se afecta cuantitativamente por la gestación, salvo un ligero descenso del ácido esteárico, de modo semejante a lo que ocurría en fosfatidilcolina. La abundante presencia de ácido palmitico en pulmón provoca que una gran proporción de este ácido esté localizada en la posición 2 de fosfatidilcolina de pulmón tanto en las conejas control como en las gestantes. Sin embargo esto no ocurre en fosfatidiletanolamina de pulmón de estos dos tipos de animales, por lo que la relación entre las posiciones 1/2 para este ácido es en ambos casos superior a la encontrada en fosfatidilcolina.

La figura 25 presenta la distribución de ácidos grasos en hígado y pulmón fetales. Estos resultados muestran que para ácidos grasos saturados la relación entre las proporciones localizadas en las posiciones 1 y 2 de fosfatidiletanolamina de hígado fetal es notablemente inferior a la relación existente en hígado control y en hígado materno (tabla III); este hecho es similar al observado para ácido palmítico en fosfatidilcolina de hígado fetal. Sin embargo, la relación entre las proporciones de la posición 1 y de la posición 2 de los principales ácidos grasos saturados (16:0 y 18:0) en fosfatidiletanolamina de pulmón fetal alcanza valores superiores al de la fosfatidileta-nolamina de hígado fetal, siendo también superiores a los de pulmón de las conejas control y gestantes (tabla III). Este incremento en la relación entre las posiciones 1/2 es debido a una fuerte disminución de los ácidos grasos saturados localizados en la posición 2. Estos resultados no coinciden con las relaciones materno-fetales descritas en la sección anterior para fosfatidilcolina de pulmón.

TABLA III

Relación entre las posiciones 1/2 de ácidos grasos saturados.

Fosfo- lípidos	Ácidos grasos	Hígado			Pulmón		
		control	madre	feto	control	madre	feto
PC	16:0	7,7	7,9	2,0	2,7	2,2	1,9
PE	16:0	11,0	6,0	2,0	4,6	5,9	7,0
PE	18:0	13,0	7,4	5,3	10,0	10,0	26,0

PE = fosfatidiletanolamina ; PC = fosfatidilcolina

Se señalaba en la sección anterior que la abundante presencia de ácido palmítico en la posición 2 de fosfatidilcolina de pulmón de conejas control y gestantes podría ser debida al hecho señalado por Vereyken et al. (1.972) de la participación de un mecanismo de desacilación-reacilación en la biosíntesis de dipalmitoil-lecitinas por microsomas de pulmón. El valor de la relación entre las posiciones 1/2 para ácido palmítico en fosfatidilcolina de hígado fetal, similar a las de pulmón materno y fetal, permite sugerir también la participación de un mecanismo de desacilación-reacilación en la síntesis de palmitoil-lecitinas en hígado fetal. Sin embargo, los resultados obtenidos en la distribución de ácido palmítico en fosfatidiletanolamina de pulmón fetal no son consecuentes con una incorporación preferente de palmitato mediante acilación de liso-fosfatidiletanolamina, sino con el mecanismo "de novo" para la biosíntesis de fosfolípidos. Así pues,

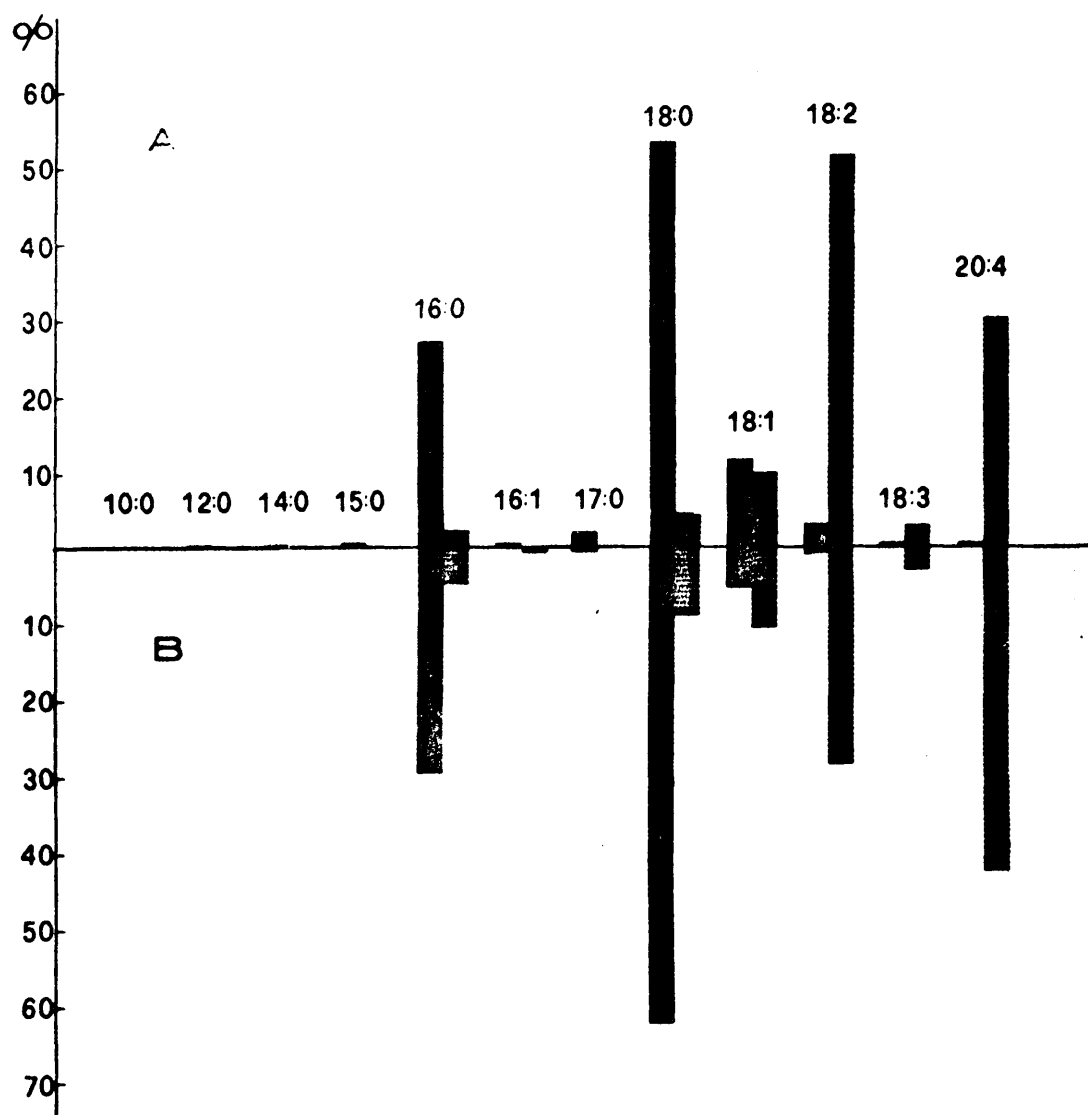


Fig. 23. Distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina de hígado de conejas control (A) y gestantes (B). Barras negras = posición 1; barras rayadas = posición 2.

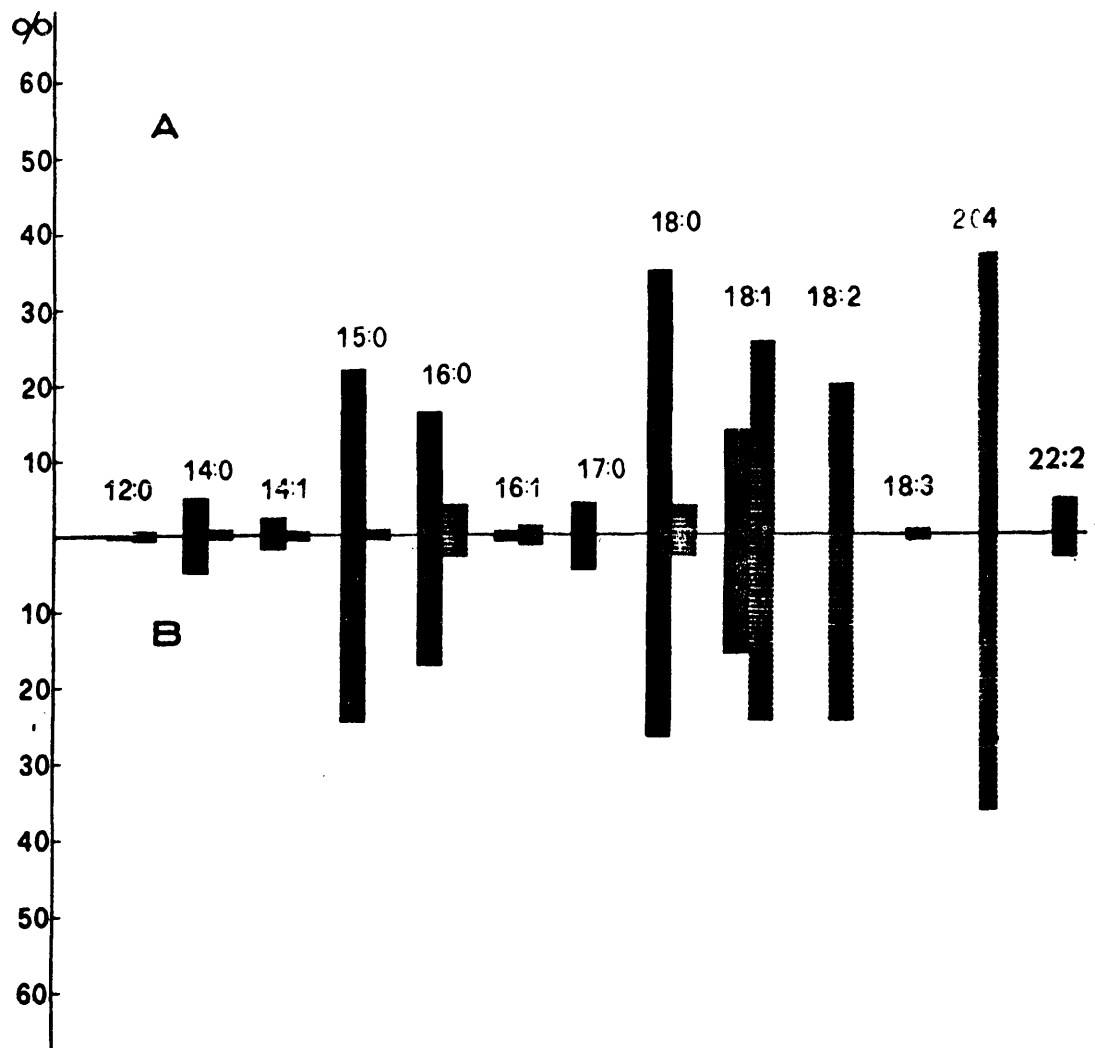


Fig. 24. Distribución de ácidos grasos en fosfatidileanolamina de pulmón de conejas control (A) y gestantes (B). Símbolos como en la figura 23.

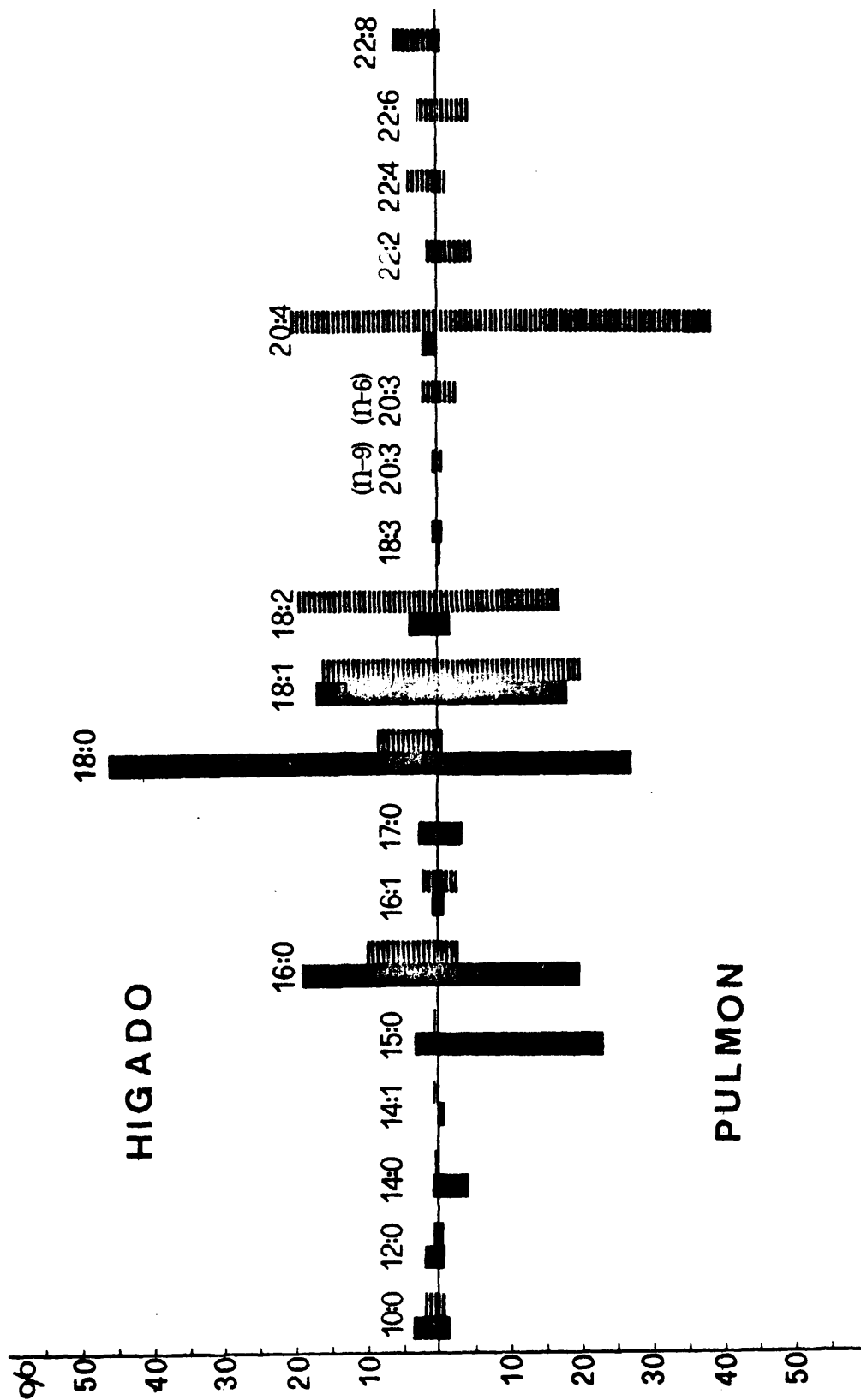


Fig. 25. Distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina de hígado y pulmón fetal. Símbolos como en la figura 23.

la ausencia de aciltransferasas específicas para fosfatidiletanolamina explicaría la inaccesibilidad de una segunda molécula de palmitato o estearato para unirse a la posición 2 del fosfolípido. Los valores de las relaciones entre las posiciones 1/2 para los ácidos palmítico y esteárico en fosfatidiletanolamina de pulmón fetal, mayores que las existentes en el fosfolípido materno, indicarían una menor participación de las reacciones de intercambio en el pulmón fetal.

Los resultados expresados en la figura 25 indican también la presencia en fosfatidiletanolamina de hígado y pulmón fetales de cantidades significativas de ácidos grasos insaturados de cadena larga localizados exclusivamente en la posición 2, los cuales no están presentes en las correspondientes fosfatidilcolinas. Este hecho resalta de nuevo el diferente comportamiento metabólico de la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina fetales. Otro hecho característico es la presencia en fosfatidiletanolamina de pulmón fetal de elevadas proporciones de ácidos grasos impares, concretamente el ácido 15:0, y del ácido poliinsaturado 20:4.

La administración prolongada de insulina no modifica la distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina de hígado y pulmón ni en conejas adultas ni en fetos.

3.5. INFLUENCIA DE LA GESTACION Y ADMINISTRACION DE INSULINA SOBRE LA DISTRIBUCION PARCIAL DE ACIDOS GRASOS EN TRIGLICERIDOS DE HIGADO Y PULMON MATERNOS Y FETALES EN CONEJOS.

Según se ha visto en la sección 3.2. , la gestación modifica la composición de ácidos grasos de los lípidos totales de hígado en conejos, siendo los cambios más nota

bles el incremento de la proporción de ácido palmítico y el descenso de las de esteárico y linoleico. Estos cambios son debidos a las variaciones en la composición de triglicéridos y fosfolípidos; los triglicéridos son responsables de los cambios que la gestación provoca en las concentraciones relativas de los ácidos grasos saturados 16:0 y 18:0.

La composición de los triglicéridos del hígado fetal es más similar a la del adulto normal que a la del hígado materno (tabla IV). Así, se puede observar que en los triglicéridos de hígado de conejas gestantes los niveles de 16:0 son mayores y los de 18:0 menores que en las conejas control. Los restantes ácidos grasos no presentan variaciones significativas. En general, la composición de ácidos grasos de los triglicéridos de hígado fetal es semejante a la de los triglicéridos de hígado de las conejas control.

TABLA IV

Porcentajes de ácidos grasos en triglicéridos de hígado de conejas control, conejas gestantes y fetos.

Conejos	14:1	15:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
Control	3,0	0,7	36,2	7,6	7,5	23,6	20,0	1,1
Gestante	3,0	1,4	45,4	6,3	2,8	21,8	18,2	1,1
Fetos	2,8	1,3	33,9	6,8	3,5	24,1	22,7	2,4

La figura 26 muestra la distribución parcial de áci dos grasos en las posiciones (1 + 3) y 2 de los triglicéridos de hígado de conejas control (A) y gestantes (B). La figura 27 muestra la distribución parcial correspondiente al pulmón de conejas control (A) y gestantes (B). En la fi gura 28 se muestran comparativamente las distribuciones parciales de ácidos grasos en hígado y pulmón fetales.

Los hechos más característicos de la distribución po sicional de ácidos grasos en triglicéridos de hígado con trol (figura 26A) son las localizaciones preferentes de 16:0 en la posición (1 + 3) y de los ácidos monoinsaturados 16:1 y 18:1 en la posición 2. Los ácidos poliinsaturados, 18:2 y 18:3, no están localizados en la posición 2 tan es pecíficamente como los ácidos grasos monoinsaturados. El incremento de ácido palmítico en los triglicéridos de hí gado provocado por la gestación aparece sólo claramente presente en la posición (1 + 3) (figura 26B).

Por otra parte, existe una clara tendencia hacia una mayor especificidad en la distribución de los ácidos gra sos insaturados 18:1 y 18:2 en los triglicéridos de hígado de conejas gestantes. La observación de la figura 26 mues tra una especificidad notablemente menor en la distribuc ión de ácidos grasos en las posiciones (1 + 3) y 2 que en los triglicéridos de hígado de conejas control y gestan tes; en cualquier caso, la distribución parcial en los tri glicéridos fetales es más similar a la de los triglicéri dos control que a la de los triglicéridos maternos. El ácido palmitoleico, sin embargo, aparece idénticamerte dis tribuido en triglicéridos de hígado control y de hígado materno y fetal.

Estos resultados parecen indicar la participación en hígado fetal y adulto de mecanismos de síntesis de tri glicéridos con una diferente especificidad según los áci-

dos grasos.

En la tabla V se expresa la composición de ácidos grasos de triglicéridos de pulmón de conejas control, conejas gestantes y fetos. Resulta evidente que la gestación no induce variaciones significativas en la composición de ácidos grasos de los triglicéridos. Los triglicéridos de pulmón fetal tienen proporciones mayores de ácido palmitico y menores de esteárico que los de pulmón adulto.

TABLA V

Porcentajes de ácidos grasos en triglicéridos de pulmón de conejas control, conejas gestantes y fetos.

Conejos	14:1	15:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
Control	3,2	1,2	32,4	8,1	6,2	24,7	21,5	2,5
Gestantes	3,6	1,1	29,9	8,5	4,0	25,9	21,8	4,2
Fetos	4,2	1,0	37,3	6,6	2,9	23,3	18,6	2,5

La figura 27 muestra las distribuciones parciales de ácidos grasos en triglicéridos de pulmón de conejas control (A) y gestantes (B). Los triglicéridos de pulmón de conejas control muestran la misma especificidad general que los triglicéridos de hígado. Sin embargo, los ácidos palmítico y oleico no están localizados tan preferentemente en las posiciones (1 + 3) y 2, respectivamente. La gestación modifica la distribución posicional de ácidos gra-

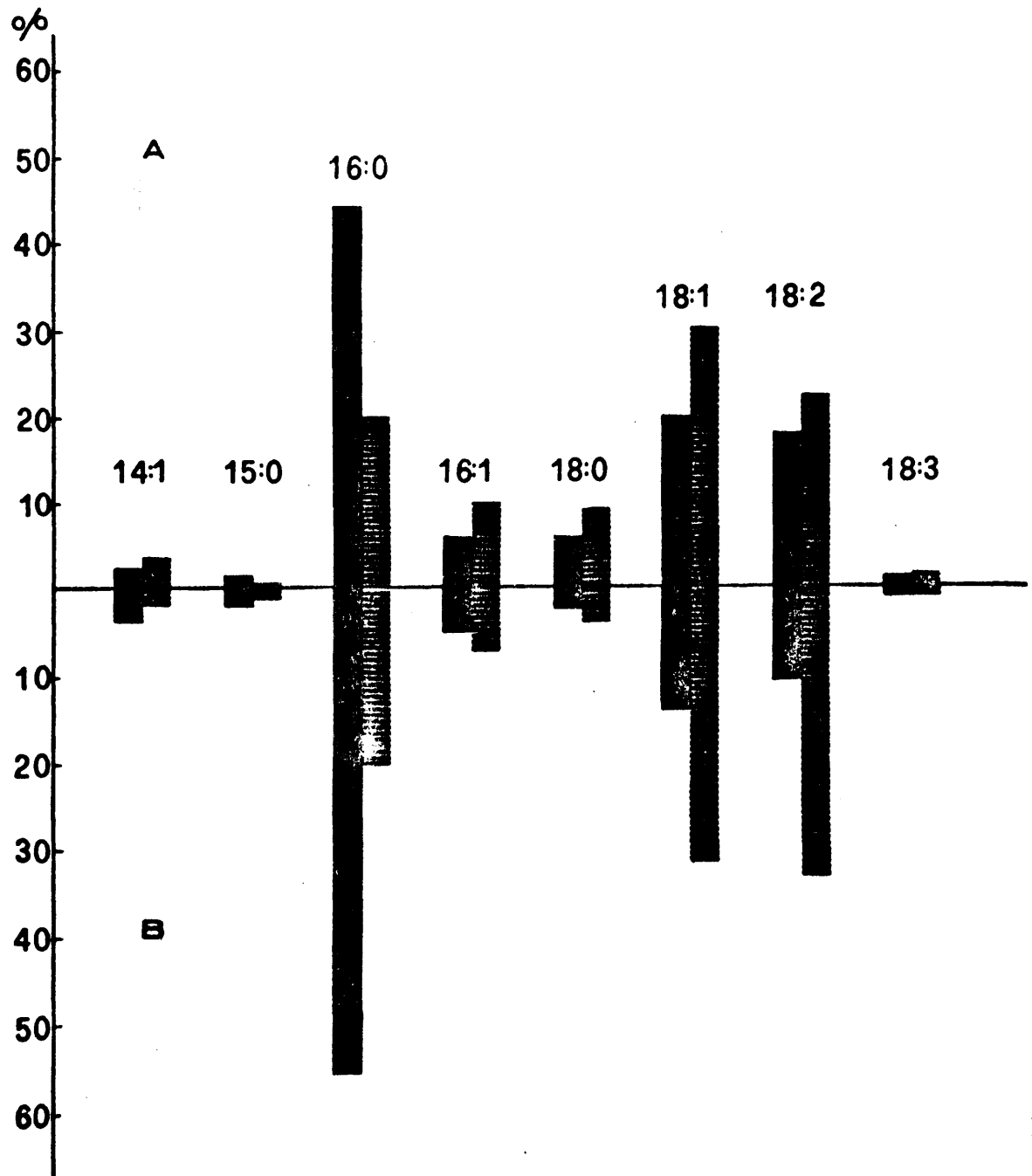


Fig. 26. Distribución parcial de ácidos grasos en triglicéridos de hígado de conejas control (A) y gestantes (B). Barras negras = posición (1 + 3); barras rayadas = posición 2.

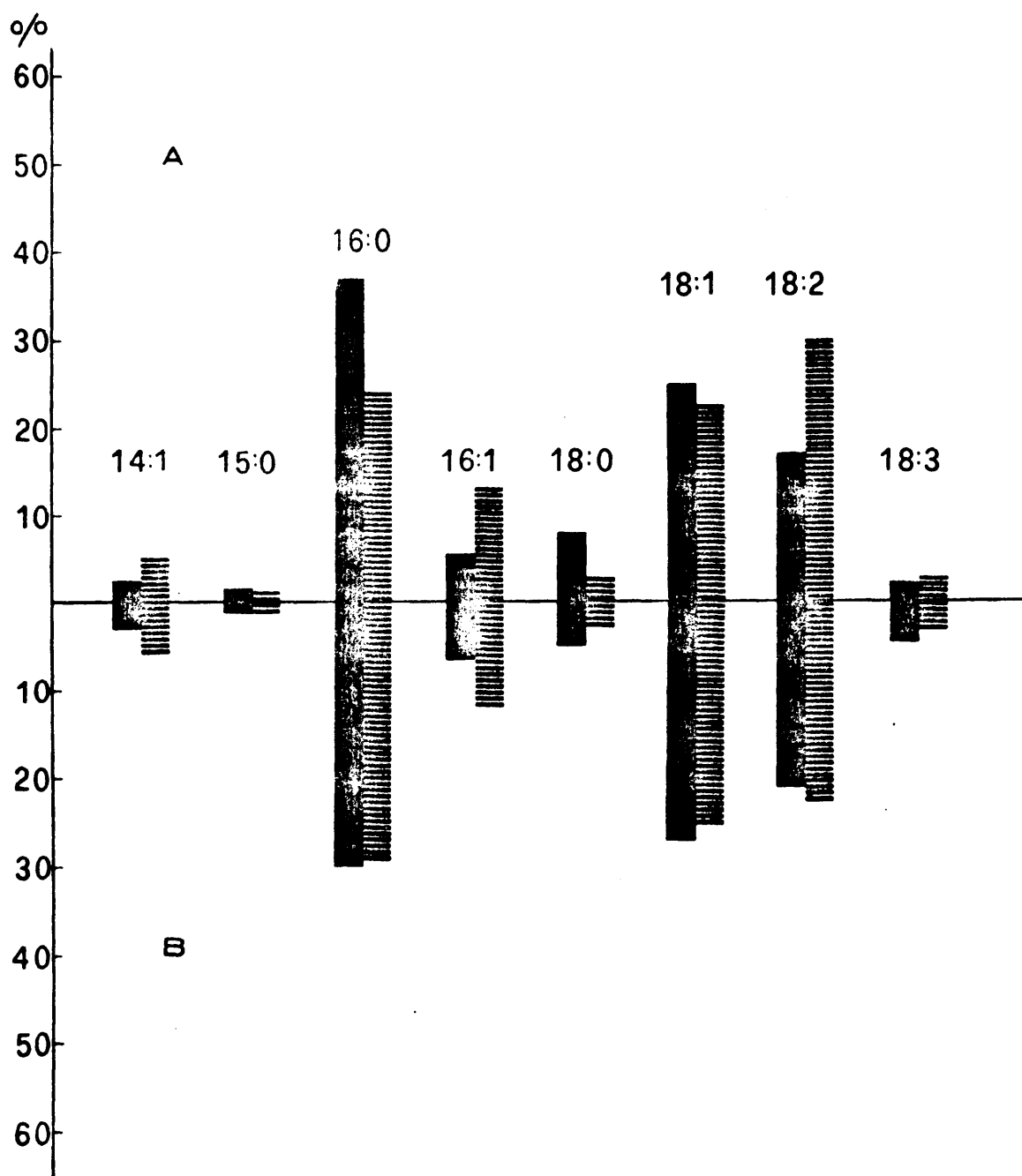


Fig. 27. Distribución parcial de ácidos grasos en triglicéridos de pulmón de conejas control(A) y gestantes (B). Símbolos como en la figura 26.

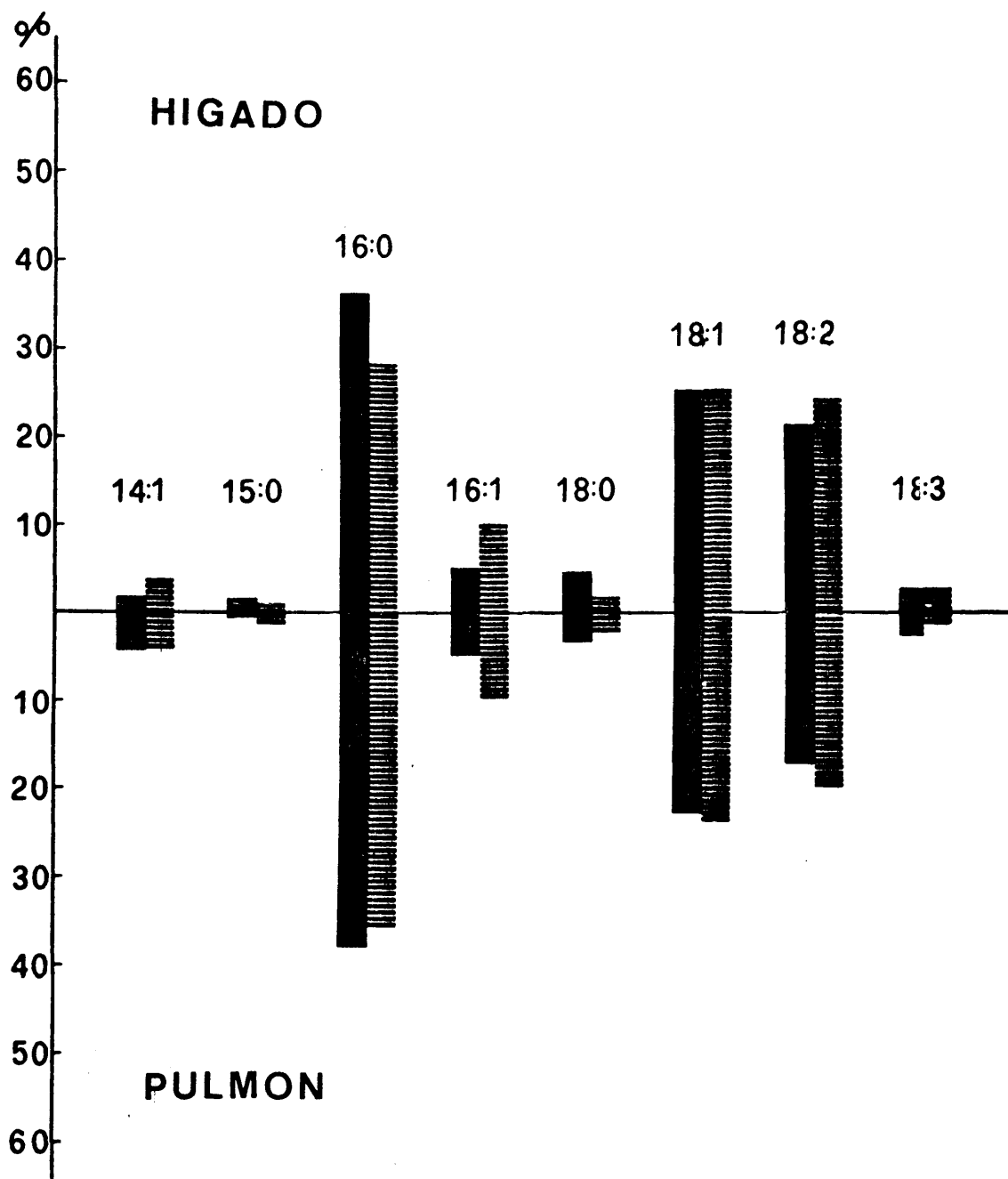


Fig. 28. Distribución parcial de ácidos grasos en triglicéridos de hígado y pulmón fetales. Símbolos como en la figura 26.

sos en los triglicéridos de pulmón, provocando una menor especificidad en la localización relativa de los ácidos grasos en las posiciones (1 + 3) y 2. Esta tendencia a igualar la distribución de ácidos grasos entre las posiciones (1 + 3) y 2 se observa claramente en los triglicéridos del pulmón fetal (figura 28); esto hace que las distribuciones parciales de ácidos grasos sean muy similares en triglicéridos de hígado y pulmón fetales.

La comparación de todos estos cambios en la distribución parcial de ácidos grasos en triglicéridos de hígado y pulmón de conejos adultos y fetos permite deducir algunas tendencias de tipo general. La gestación induce cambios en la distribución parcial de ácidos grasos de triglicéridos de ambos órganos. Estos cambios, sin embargo, se producen de forma opuesta, de modo que las diferencias de concentraciones de los ácidos grasos localizados en las posiciones (1 + 3) y 2 se elevan en hígado y disminuyen en pulmón de las conejas gestantes (figuras 26 y 27). Sin embargo, las distribuciones parciales de los triglicéridos fetales de hígado y pulmón son muy similares entre si (figura 28); también se observa una gran similitud entre las distribuciones parciales de ácidos grasos de triglicéridos de pulmón materno y fetal.

3.6. ESTUDIOS "IN VITRO" DE LAS ENZIMAS DE LA BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS Y SU REGULACION EN CONEJOS.

3.6.1. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD DE ACETIL-CoA CARBOXILASA Y DE LOS MECANISMOS DE BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS EN HIGADO ADULTO Y FETAL DE CONEJOS. INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACION DE INSULINA.

La figura 29 muestra las actividades de las enzimas de la síntesis de ácidos grasos en hígado de conejas adultas normales y gestantes así como en hígado de fetos de conejo. La actividad de acetil-CoA-carboxilasa hepática exhibe un descenso sustancial durante la gestación, mostrando el hígado de feto una actividad muy baja. El tratamiento con insulina durante un período prolongado de tiempo provoca una clara disminución de la capacidad máxima de la enzima que muestra el hígado adulto normal; esta disminución se observa también en hígado materno y fetal.

La figura 29 muestra también la capacidad de síntesis de ácidos grasos a partir de (1- ^{14}C) acetil-CoA en hígado de conejos. La síntesis de ácidos grasos por el hígado fetal es notablemente mayor que la llevada a cabo tanto en el hígado adulto normal como en el gestante. La administración prolongada de insulina estimula claramente la síntesis de ácidos grasos a partir de ^{14}C -acetil-CoA en hígado de conejas gestantes y normales.

Estos resultados sugieren la existencia de un sistema predominante para la síntesis de ácidos grasos que es distinto en hígado adulto y fetal. La muy baja actividad de acetil-CoA-carboxilasa que posee el hígado fetal y su superior capacidad de síntesis de ácidos grasos permiten sugerir que un mecanismo de elongación (Wakil, 1.961) es el sistema predominante de síntesis en el hígado fetal; por el contrario, las actividades encontradas en los hígados de conejas adultas están de acuerdo con la participación predominante de un mecanismo "de novo". Estos resultados están de acuerdo con el hecho bien establecido de que los sistemas de biosíntesis están implicados de modo preferente dependiendo del tejido de que se trate así como de sus condiciones metabólicas. Estos resultados también están de acuerdo con la hipótesis propuesta por Donaldson y Müller (1.971) de que en hígado de pollo las acti-

vidades del mecanismo microsomal y de la síntesis "de novo" son mayores que la actividad del sistema mitocondrial y que el sistema predominante de síntesis de ácidos grasos en hígado de embrión de pollo es la elongación mitocondrial. También se ha encontrado que en cerebro de rata en estado de desarrollo la actividad de la enzima responsable de la elongación de ácido esteárico disminuye rápidamente después del nacimiento (Strove-Vallet y Pascaud, 1.971).

La administración de insulina provoca una tendencia clara a disminuir la participación del mecanismo "de novo" en la síntesis de ácidos grasos.

3.6.2. INFLUENCIA DE LOS NUCLEOTIDOS REDUCIDOS DE PIRIDINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ACETIL-CoA CARBOXILASA Y LA SINTESIS DE ACIDOS GRASOS

De estos resultados, que se expresan en la figura 30 se observa claramente que ambas actividades se incrementan con las concentraciones de NADH y NADPH dentro de un intervalo de 0-3 $\mu\text{mol/ml}$ de ambos nucleotidos reducidos. El efecto activador de NADH sobre la síntesis de ácidos grasos a partir de ^{14}C -acetil-CoA fue siempre superior al producido por NADPH. La fracción mitocondrial de varios tejidos de mamíferos posee un mecanismo de elongación que utiliza acetil-CoA como sustrato (Wit-Peters, 1.969) y NADH como donador de hidrógeno para la elongación de acil derivados de CoA; de acuerdo con esto, la diferencia entre los efectos activadores de NADH y NADPH (figura 30) disminuye en el orden hígado de adulto control, hígado materno e hígado fetal. Este orden es consecuente con la disminución de la actividad de acetil-CoA carboxilasa observada en la figura 29.

En la figura 30 se muestra también la influencia de los nucleotidos reducidos de piridina sobre la actividad

de acetil-CoA carboxilasa. Se encontró que el NADPH tiene un marcado efecto activador sobre esta actividad enzimática cuando se ensaya en el intervalo de concentraciones de 0 a 3 $\mu\text{mol/ml}$; sin embargo, el efecto activador de NADPH sobre la actividad de acetil-CoA carboxilasa en hígado fetal es muy pequeño. Hay que destacar que la presencia de NADH provoca sólo un ligero efecto sobre esta actividad enzimática.

Los hechos descritos hasta este momento nos dan una indicación acerca del control de la producción de ácidos grasos y de malonato, pero no explican el origen de la alteración de estas actividades por nucleótidos reducidos de piridina. Un incremento en la relación NADP/NADPH actuaría como una señal importante del control de la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP que provocaría un incremento en la velocidad del ciclo tricarboxílico. El efecto inhibidor de NADPH sobre la oxidación de isocitrato daría lugar a una elevación de los niveles de citrato e isocitrato, provocando una activación de la acetil-CoA carboxilasa. Por otra parte, la combinación de varios efectos es un mecanismo usual que permite un control más fino que el resultado de un único efecto (Krebs, 1.970).

La hipótesis sobre este efecto regulador enunciada anteriormente debería ser corroborada por estudios "in vitro" de la síntesis de malonato a partir de acetil-CoA y $^{14}\text{CO}_2$ en presencia de varias concentraciones relativas de citrato y NADPH. Los cambios observados en la biosíntesis de malonato por homogeneizados de hígado de conejas adultas normales aparecen expresados en la figura 31. Estos resultados no pueden ser explicados por la simple hipótesis del efecto activador de isocitrato y citrato estimulado por NADPH. El citrato sólo presenta un incremento óptimo de actividad alrededor de 3 $\mu\text{mol/ml}$ y concentraciones más elevadas provocan una fuerte disminución del material resistente al tratamiento ácido; esto podría inter-

pretarse como debido a una inhibición feedback de la acetil-CoA carboxilasa por malonato. La adición de NADPH incrementa ligeramente la actividad enzimática en el intervalo de 0 a $3\mu\text{mol/ml}$ de citrato; este incremento de la actividad de acetil-CoA carboxilasa por NADPH en ausencia de citrato podría ser debida a la reversión de la reacción de la isocitrato deshidrogenasa. Sin embargo, a concentraciones 0.5 y $1.0\mu\text{mol/ml}$ de NADPH se produce una desinhibición clara del efecto producido por citrato $5\mu\text{mol/ml}$ y esto no puede ser atribuido a la sencilla hipótesis enunciada anteriormente. Este efecto activador de NADPH sobre la actividad de acetil-CoA carboxilasa a pesar de la fuerte reducción de la actividad provocada por $5\mu\text{mol/ml}$ de citrato sugiere que el nucleótido reducido elimina el efecto inhibitor del malonato al promover su utilización para la síntesis de ácidos grasos. Estos resultados obviamente concuerdan con el máximo efecto de NADPH (figura 30) sobre la acetil-CoA carboxilasa de hígado adulto normal que tiene como sistema principal para la biosíntesis de ácidos grasos un mecanismo "de novo".

3.6.3. INFLUENCIA DE MALONIL-CoA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ACETIL-CoA CARBOXILASA Y LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS. EFECTO DE AVIDINA.

En la figura 32 se expresa la influencia de malonil-CoA sobre la actividad de acetil-CoA carboxilasa de hígado de conejas normales. La malonil-CoA en ausencia de citrato inhibe ligeramente la actividad de la enzima, pero la presencia simultánea de citrato provoca una inhibición pronunciada; la máxima inhibición por citrato se produce a la concentración de este metabolito que provoca la máxima inhibición de la actividad enzimática en ausencia de NADPH (figura 31). De estos resultados se deduce por tanto que el efecto inhibitor de malonil-CoA sobre la actividad de acetil-CoA carboxilasa requiere la presencia de

la forma activa de la enzima.

También se estudió el efecto regulador de malonil-CoA sobre la actividad de acetil-CoA carboxilasa y sobre la biosíntesis de ácidos grasos en hígado de conejas control, conejas gestantes y fetos, y los resultados obtenidos se muestran en la tabla VI comparativamente con los obtenidos con acetil-CoA. La presencia de malonil-CoA incrementa la capacidad de biosíntesis de ácidos grasos sobre todo en hígado de conejas control, mientras que el incremento observado con hígado fetal era muy pequeño, en concordancia con la idea de que su mecanismo principal para la síntesis de ácidos grasos es un sistema de elongación.

La influencia de malonil-CoA sobre la actividad de acetil-CoA carboxilasa de los tres orígenes estudiados está también de acuerdo con la participación relativa de los diferentes mecanismos de síntesis de ácidos grasos. La presencia de acetil-CoA provoca un incremento en la capacidad de síntesis de ácidos grasos menor que el producido por malonil-CoA.

La tabla VII muestra la influencia ejercida por avidina sobre la actividad de acetil-CoA carboxilasa y sobre la capacidad de síntesis de ácidos grasos en hígado de conejas control y de fetos. Los resultados expresados en la tabla VII refuerzan la idea de una diferente participación de los distintos mecanismos de síntesis de ácidos grasos en hígado adulto y fetal. Así, la avidina en ausencia de citrato inhibe la actividad de acetil-CoA carboxilasa de hígado adulto más fuertemente que la actividad de hígado fetal; la presencia simultánea de citrato (6 $\mu\text{mol/ml}$) ejerce un efecto antagónico del efecto inhibidor de avidina. Por otra parte, a mayor inhibición de acetil-CoA carboxilasa por avidina, mayor estimulación de la capacidad de síntesis de ácidos grasos, sugiriendo que la acetil-CoA contribuye a facilitar la actuación de los sistemas de

elongación cuando está inhibido el mecanismo "de novo".

TABLA VI

Influencia de acetil-CoA y malonil-CoA sobre la síntesis de ácidos grasos a partir de ^{14}C - acetil-CoA (S) y sobre la actividad de acetil-CoA carboxilasa (C) en hígado de conejo.

cantidad añadida $\mu\text{mol/ml}$	conejas control		conejas gestantes		fetos	
	S	C	S	C	S	C
Control (6 $\mu\text{mol/ml}$ citrato)	100	100	100(97)	100(65)	100(367)	100(15)
1.0 acetil -CoA	150	92	377	87	133	104
2.0 acetil -CoA	155	86	252	77	113	89
1.0 malonil -CoA	3.105	105	710	100	196	108
2.0 malonil -CoA	3.170	80	855	85	192	90

Los valores se expresan como porcentajes relativos de las experiencias control. Los valores de las conejas gestantes y fetos se expresan también (en paréntesis) como porcentajes de los animales control.

TABLA VII

Influencia de avidina sobre la síntesis de ácidos grasos (S) y sobre la actividad de acetil CoA carboxilasa (C) en hígado de conejo.

Cantidad añadida μmol/ml	<u>conejas control</u>		<u>fetos</u>	
	S	C	S	C
Control (6 μmol/ml citrato)	100	100	100(365)	100(15)
+0.1 avidina	120	102	101	95
+0.25 avidina	122	98	100	96
+0.5 avidina	124	94	101	98
control (sin citrato)	91	35	110	93
1.0 acetil-CoA	94	30	175	95
+1.0 acetil-CoA 0.25 avidina	199	11	162	64
+1.0 acetil-CoA 0.50 avidina	262	9	172	63

Los valores se expresan como porcentajes relativos de las experiencias control.

Los valores de feto se expresan también (en paréntesis) como porcentajes de los animales control.

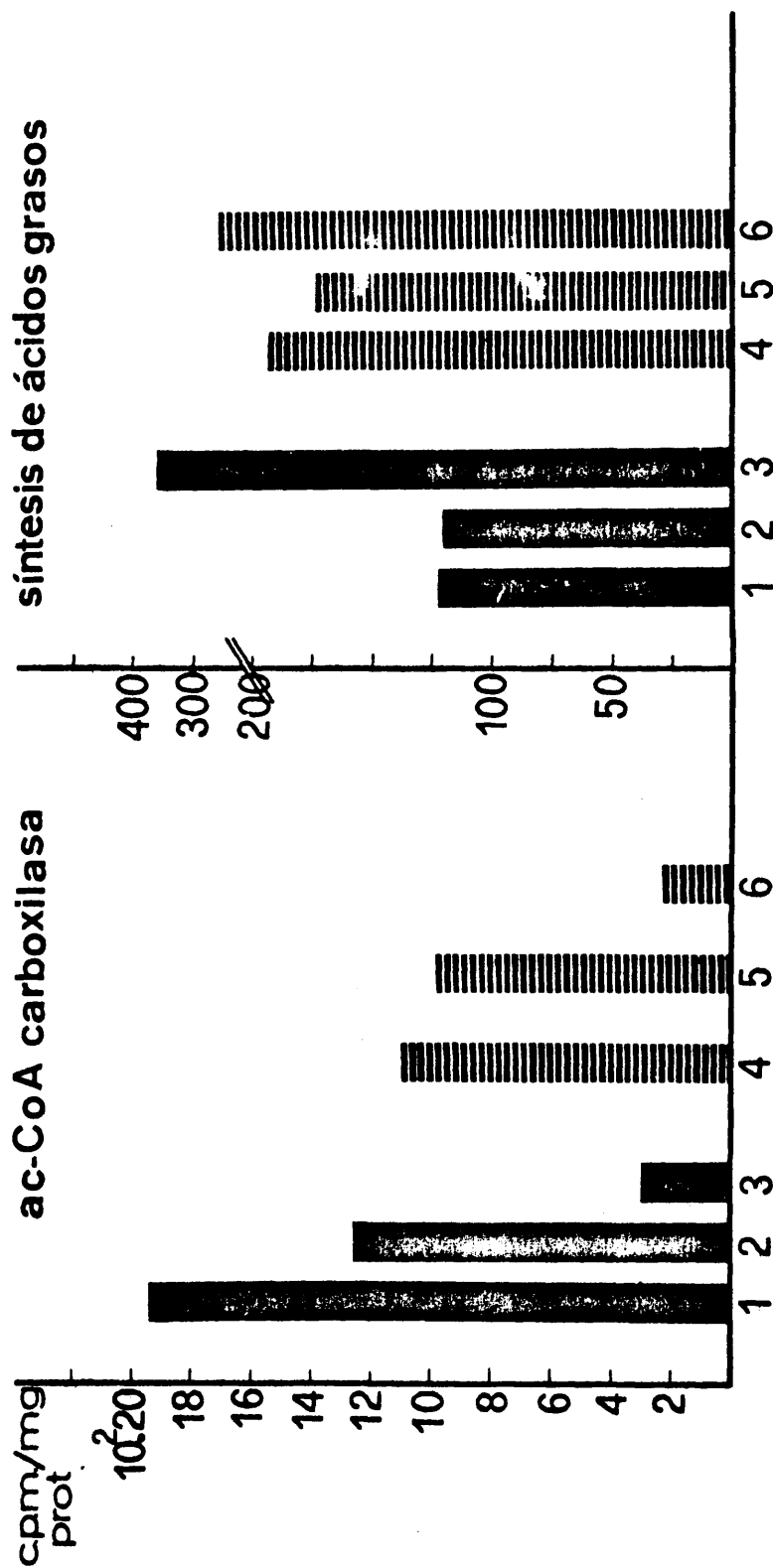


Fig. 29. Actividad de acetil-CoA carboxilasa y síntesis de ácidos grasos en hígado de conejas control (1) y gestantes (2) y en hígado fetal (3). Influencia del tratamiento con insulina sobre estas actividades en hígado de conejas control (4) y gestantes (5) y en hígado fetal (6).

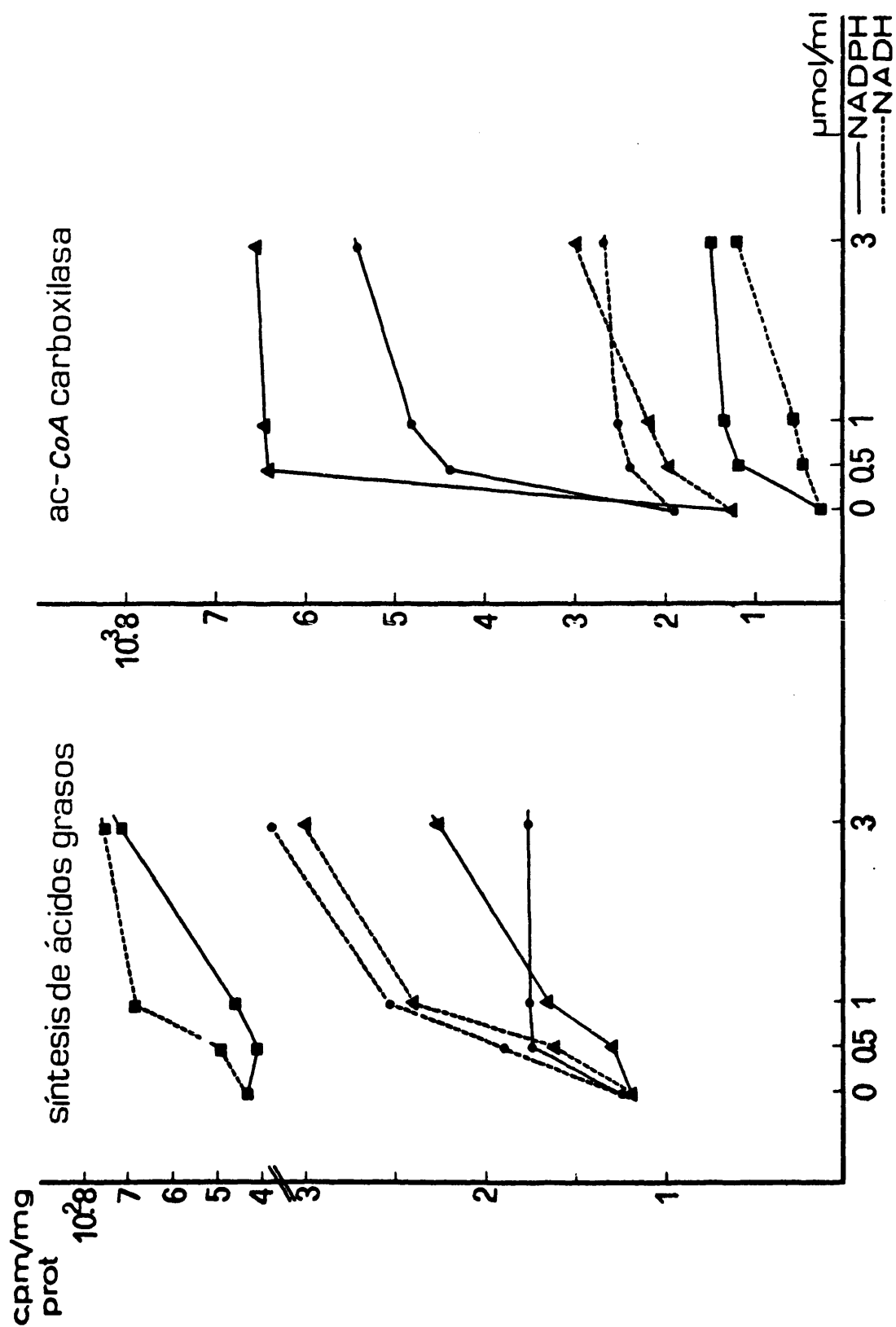


Fig. 30. Influencia de diferentes concentraciones de NADH y NADPH sobre la síntesis de ácidos grasos y la actividad de acetil-CoA carboxilasa. (●) Hígado control, (▲) hígado gestante, (■) hígado fetal.

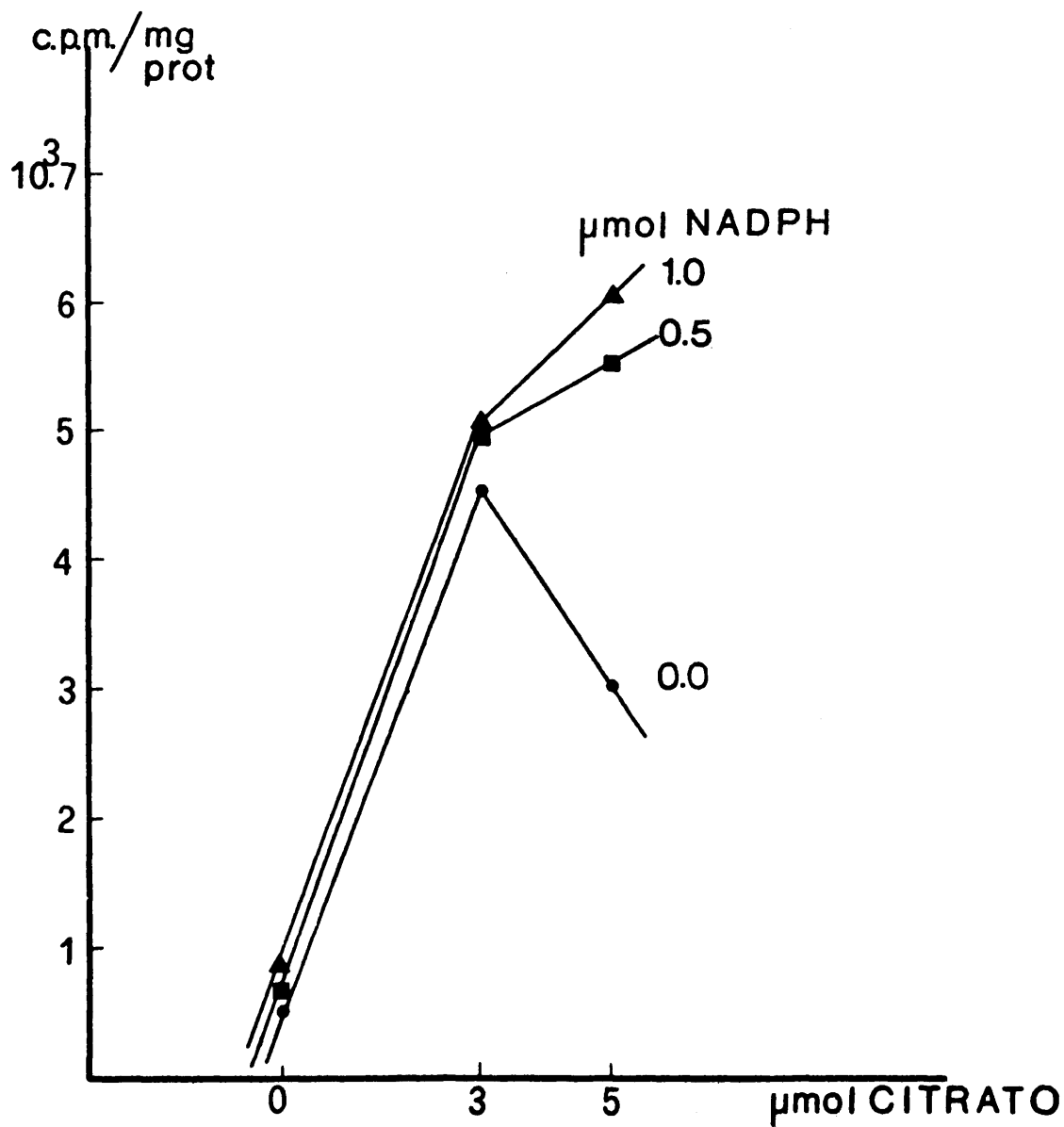


Fig. 31. Influencia de diferentes concentraciones relativas de citrato y NADPH sobre la actividad de acetil-CoA carboxilasa en hígado control.

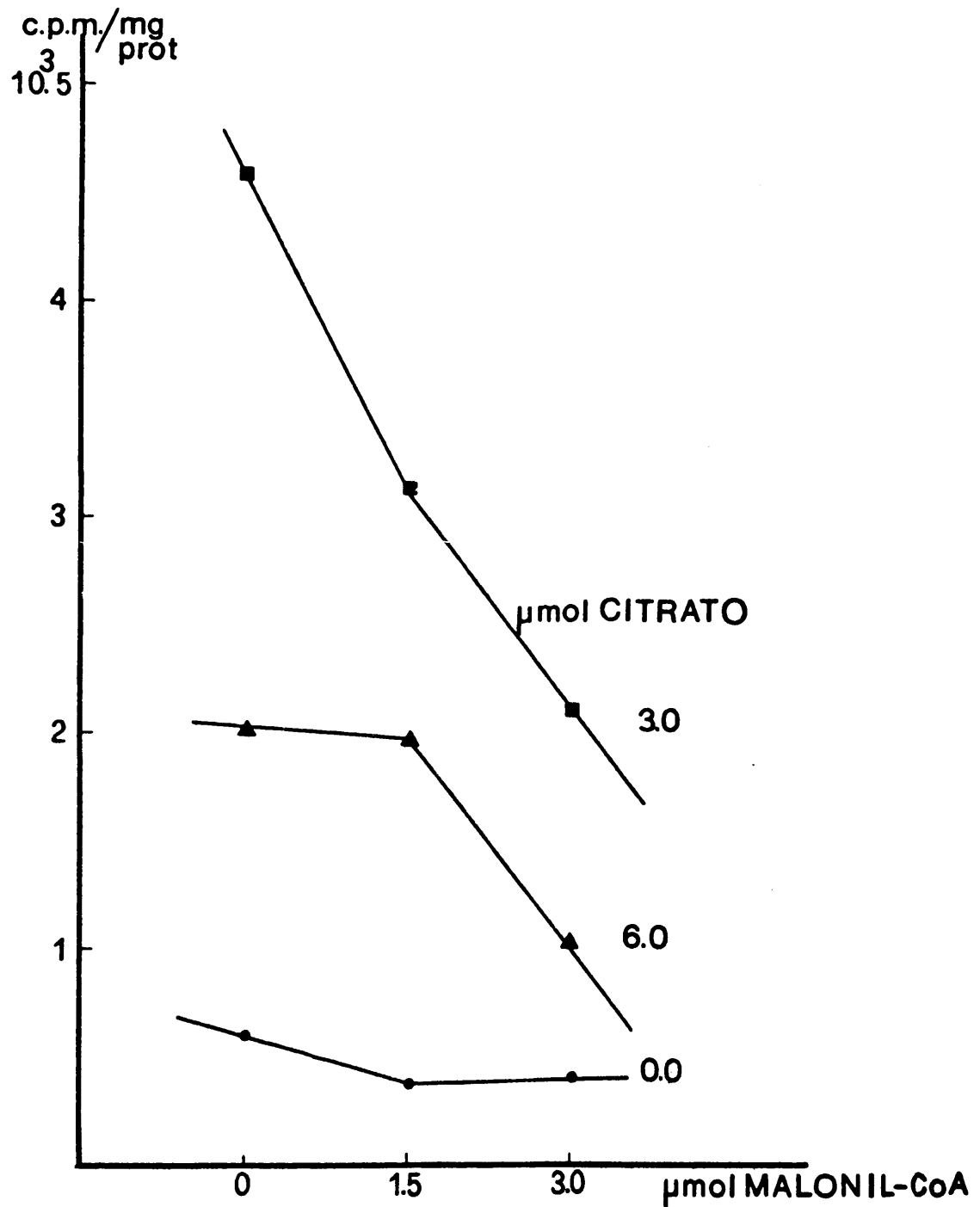


Fig. 32. Influencia de diferentes concentraciones relativas de malonil-CoA y citrato sobre la actividad de acetil-CoA carboxilasa en hígado control.

3.7. ADENIL CICLASA EN TEJIDOS DE CONEJO

3.7.1. ESTUDIOS PREVIOS.

Al iniciar este estudio fue necesario determinar las condiciones óptimas para llevar a cabo los ensayos de actividad de adenil ciclasa en los diferentes tejidos estudiados.

Uno de los primeros problemas abordados fue la obtención de las preparaciones enzimáticas procedentes de los tejidos. Se encontró que de los diferentes medios de homegeneización ensayados, la utilización de sacarosa 0,25M permitió obtener la mayor actividad enzimática por lo que fue adoptado como medio de homegeneización en todos los casos. Se determinaron asimismo la temperatura y el pH óptimos así como los tiempos de incubación dentro de los cuales la formación de AMP cíclico varía linealmente con el tiempo. Todos estos aspectos, junto con la influencia de los diferentes cofactores utilizados sobre la actividad enzimática, permitieron establecer las condiciones experimentales para el ensayo de actividad de adenil ciclasa, las cuales han sido descritas en la parte experimental de esta memoria (sección 2.8.3.1.). Según se indicaba allí, en la determinación de la actividad de adenil ciclasa se plantean tres problemas fundamentales: mantenimiento de la concentración de sustrato (ATP), inhibición de la hidrólisis del AMP cíclico por fosfodiesterasas y separación y determinación cuantitativa del AMP cíclico formado. En relación con este último aspecto hay que señalar que la utilización como sustrato de ATP marcado radiactivamente en posiciones distintas al grupo α -fosfa to da lugar a la formación de productos radiactivos diferentes del AMP cíclico, los cuales proceden de la transformación o defosforilación del ATP, siendo algunos de ellos difíciles de separar del AMP cíclico. Así, hemos comprobado que utilizando como sustrato radiactivo ATP-8-¹⁴C

o ATP-2-³H, al pretender separar el AMP cíclico formado de los restantes nucleótidos mediante cromatografía en papel unidimensional utilizando un sistema de isopropanol-anoniaco-agua (7:1:2, V/V/V), sistema descrito por varios autores para llevar a cabo esta separación, se encontró que la radiactividad cromatografiada junto con el AMP cíclico utilizado como "carrier" corresponde casi en su totalidad a hipoxantina. Para evitar la contaminación del AMP cíclico por productos de defosforilación del ATP, se ha utilizado como sustrato radiactivo ATP- α -³²P, y la separación cromatográfica del AMP cíclico se lleva a cabo en cromatografía en papel utilizando el sistema etanol 95%-acetato amónico 1M (7:3, V/V).

3.7.2. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS EN EL MEDIO DE INCUBACION SOBRE LA FORMACION DE AMP CICLICO.

Este estudio se llevó a cabo a fin de determinar la dependencia entre la formación de AMP cíclico y la concentración de proteínas en el medio de incubación, utilizando preparado enzimático total de tejido adiposo e hígado de conejas control y de placenta a término. La formación de AMP cíclico corresponde a la actividad de adenil ciclase estimulada por NaF 8mM y los ensayos enzimáticos se realizaron en un medio de incubación cuya composición es la siguiente: Tris-ClH 40mM, pH 7,5; ATP 0,4 mM; MgCl₂ 5mM; NaF 8mM; fosfoenolpirúvico 6 mM; pirúvico quinasa 0,05 ng/ml; cafeína 8mM y AMP cíclico 2 mM.

Los resultados obtenidos se expresan en la figura 33 y permiten deducir en cada caso la dilución adecuada del homogeneizado total de modo que la concentración de proteínas resultante se encuentre dentro del intervalo de variación lineal de la actividad enzimática.

3.7.3. ACTIVIDAD DE ADENIL CICLASA EN TEJIDO ADIPOSEO E HIGADO DE CONEJAS CONTROL. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ATP Y ACTIVACION POR FLUORURO.

Se estudió el efecto de la concentración de ATP hasta un valor de 0,8 mM, en ausencia y en presencia de F^- (8 mM) en el medio de incubación; en estos ensayos se mantiene constante la relación de concentraciones $ATP/Mg^{2+} = 1/12,5$. En el medio de ensayo están presentes además los restantes componentes que constituyen el medio básico de incubación en las concentraciones indicadas en la sección 2.8.3.1. Los resultados obtenidos se han representado en la figura 34.

Se deduce claramente que en el intervalo de concentraciones ensayado, el ATP estimula la actividad de adenil ciclasa tanto basal como estimulada por fluoruro. Esto está de acuerdo con el hecho conocido de que el sustrato de la reacción enzimática es el complejo $ATP-Mg^{2+}$; por otra parte, diversos autores han comprobado que el ATP libre inhibe la adenil ciclasa de diferentes órganos de mamíferos, inhibición que puede ser eliminada incrementando la concentración de Mg^{2+} en el medio de incubación. Por esta razón, al utilizar en nuestros ensayos un exceso constante de Mg^{2+} con respecto a ATP, esa inhibición no se manifiesta en ningún caso, por lo que el efecto observado es una activación creciente a medida que aumentan las concentraciones de ATP y Mg^{2+} .

La dependencia de la actividad basal de adenil ciclasa de tejido adiposo con respecto a la concentración de $ATP-Mg^{2+}$ muestra un perfil sigmoidal pero el marcado desplazamiento de la curva en presencia de NaF 8mM indica un aumento en la afinidad de la enzima por el sustrato, lo que sugiere una posible interacción alostérica. Además, la presencia de F^- 8mM provoca un incremento en la velocidad de reacción.

Por lo que respecta a la adenil ciclasa de hígado, el efecto más notable provocado por la presencia de F^- 8 mM es el fuerte incremento en la velocidad de reacción.

3.7.4. INFLUENCIA DE LA GESTACION SOBRE LA ACTIVIDAD DE ADENIL CICLASA.

El estudio de la actividad de adenil ciclasa en tejido adiposo e hígado de conejas gestantes y en hígado fetal y placenta a término puede servir de base para una posible interpretación de los efectos que la gestación provoca en el metabolismo lipídico en conejos, así como un aporte de ideas acerca del papel desempeñado por esta actividad enzimática en el metabolismo fetal.

Los resultados obtenidos se expresan en la tabla VIII comparandolos con las actividades basal y estimulada por fluoruro en tejido adiposo e hígado de conejas control. El ensayo se realiza utilizando el medio de incubación básico, esto es, Tris-ClH pH 7,5, 40 mM; ATP 0,4 mM; $MgCl_2$ 5 mM; fosfoenolpirúvico 6 mM; pirúvico quinasa 0,05 mg/ml; cafeína 8 mM y AMP cíclico 2 mM, en ausencia o en presencia de NaF 8 mM.

La actividad basal de adenil ciclasa en hígado de conejas gestantes a término es ligeramente superior a la correspondiente al hígado de los animales control y, al igual que ésta, se estimula por fluoruro 8 mM aproximadamente a un valor doble con respecto a la actividad basal. Este incremento en la actividad de adenil ciclasa hepática durante la gestación, debido a la actividad glucogenolítica del AMP cíclico, podría significar un mayor aporte de glucosa, lo cual estaría de acuerdo con la idea expresada anteriormente de un flujo incrementado de este metabolito en dirección a la unidad feto-placentaria. Por otra

TABLA VIII

Actividad de adenil ciclase en tejidos adultos y fetales en conejos.

<u>Tejido</u>	<u>GESTANTE</u>		<u>CONTROL</u>	
	<u>Basal</u>	<u>Estimulada por F⁻ 8 mM</u>	<u>Basal</u>	<u>Estimulada por F⁻ 8 mM</u>
Adiposo	31,2	130,5	133	275
Hígado adulto	19,2	37,9	14,2	23,4
Hígado fetal	5,8	20,5		
Placenta	6,8	92,6		

La actividad de adenil ciclase se expresa en $\frac{\text{P mol AMP-c}}{\text{mg prot} \times \text{min}}$

parte, los resultados obtenidos de actividad de adenil ciclasa en hígado materno y fetal están de acuerdo con los obtenidos por Bär y Hahn (1.971) en adenil ciclase de hígado de rata durante el desarrollo; estos autores encuentran en el hígado fetal a término una actividad de adenil ciclase inferior a la del hígado adulto, la cual se incrementa después del nacimiento del animal; la actividad estimulada por fluoruro sigue una evolución análoga a lo largo del desarrollo, al igual que ocurre con las actividades estimuladas por glucagón y adrenalina.

Desde el punto de vista de regulación del metabolismo lipídico, la acción más importante del AMP cíclico reside en su activación de la lipólisis. Se observa que en tejido adiposo la actividad de adenil ciclasa tanto basal como estimulada por F^- 8 mM disminuye en conejas gestantes con respecto a los animales control, en aparente contradicción con una posible estimulación de la actividad lipolítica al término de la gestación, reflejada en los niveles de ácidos grasos libres en suero. En este sentido, hay que destacar que el incremento en los niveles de ácidos grasos libres durante la gestación en conejos (sección 3.1), al igual que ocurre en humanos, no parece ser debido a una disminución en la utilización de glucosa por las células del tejido adiposo, sino fundamentalmente a una mayor actividad lipolítica en este tejido. Esta idea, ampliamente documentada en la sección 1.9.2 de la presente memoria, se puede centrar en tres aspectos aparentemente bien demostrados: (a) una hipersensibilidad del tejido adiposo a la acción de agentes lipolíticos, tales como catecolaminas, durante la gestación; (b) la existencia durante la gestación de alteraciones que afectan al metabolismo de glucosa, consistentes principalmente en una reducción de la tolerancia a glucosa así como una resistencia a los efectos de insulina, cambios que pueden ser considerados como una adaptación al crecimiento de la unidad feto-placentaria al ser desviada la glucosa hacia el metabolismo fetal a la vez que la madre utiliza los lípidos previamente almacenados como fuente de energía en sustitución de glucosa; (c) un incremento durante la gestación en la secreción de factores endocrinos que poseen actividad lipolítica (STH, catecolaminas) y probablemente una hiperactividad del sistema nervioso simpático en torno al tejido adiposo; a esto se añade la producción por la placenta de hormonas propias que contribuyen a potenciar los efectos lipolíticos y antiinsulínicos de la gestación. Se puede concluir, por tanto, que los diferentes factores

enunciados pueden ser responsables, al menos en parte, de la elevada actividad lipolítica durante la gestación.

Así pues, en la situación endocrina provocada por la gestación se puede suponer, y de hecho se ha observado a nivel fisiológico e histológico en varias especies, un hiperinsulinismo secundario que puede ser explicado en función de una movilización mucho más rápida de la insulina, relacionada con una degradación de esta hormona por las enzimas proteolíticas de la placenta ("insulinasa").

Los hechos anteriormente citados justifican por si solos la importancia de un estudio acerca de las variaciones hormonales durante la gestación, y sobre todo las referentes a insulina, así como la sensibilidad del tejido adiposo a la estimulación lipolítica, aspectos que constituyen el planteamiento central de las investigaciones actualmente en curso como continuación del estudio presentado en esta memoria.

Se ha puesto de manifiesto la existencia de una actividad de adenil-ciclase en placenta a término en conejos. La característica más notable de esta actividad enzimática es la fuerte activación (casi 14 veces) que experimenta en presencia de $F^{-} 8mM$. Aunque el posible papel de esta actividad enzimática en la placenta no está bien definido, es posible que esté relacionado con el efecto activador que el AMP cíclico ejerce sobre la biosíntesis de esteroides (hormonas esteroídicas, entre otras) y sobre la glu-cogenolisis en la placenta.

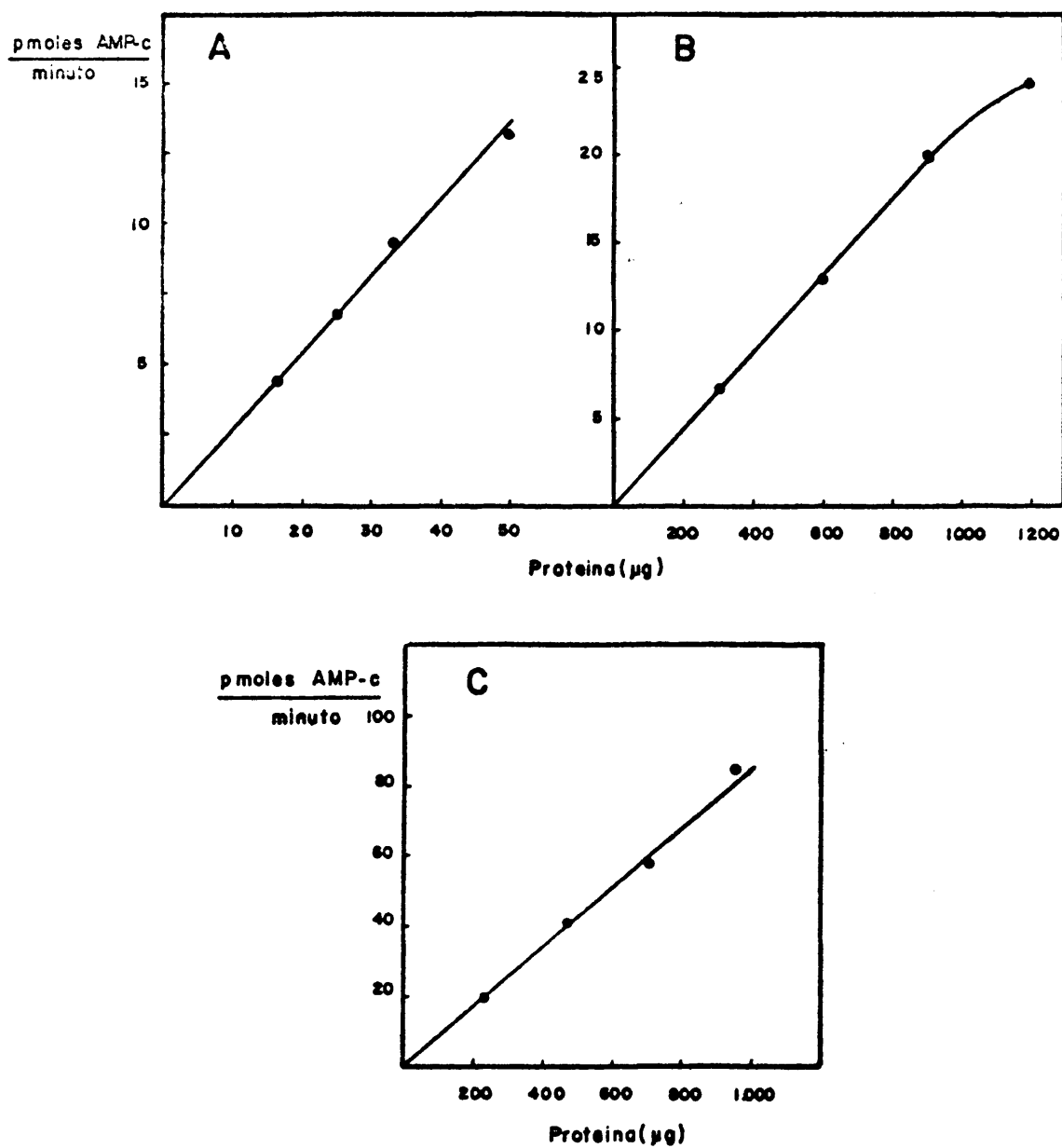


Fig. 33. Relación entre la formación de AMP-c y la cantidad de proteína en la incubación de homogeneizados totales de tejido adiposo (A) e hígado (B) de conejas control y de placenta a término (C). Los ensayos se realizan en presencia de NaF 8 mM.

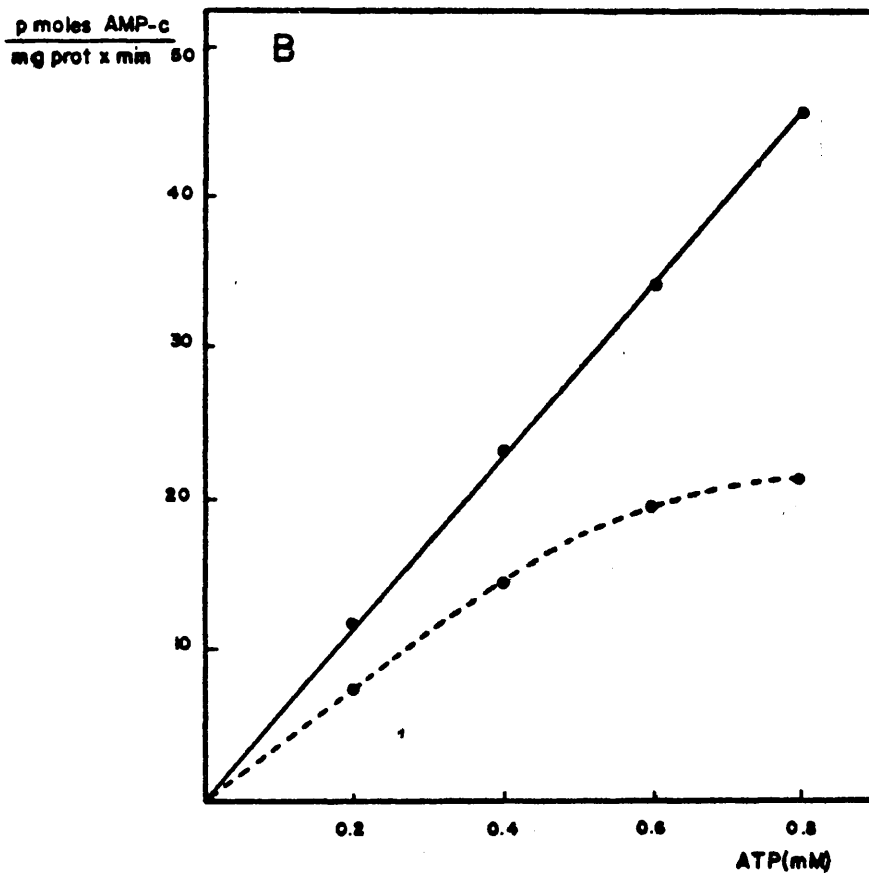
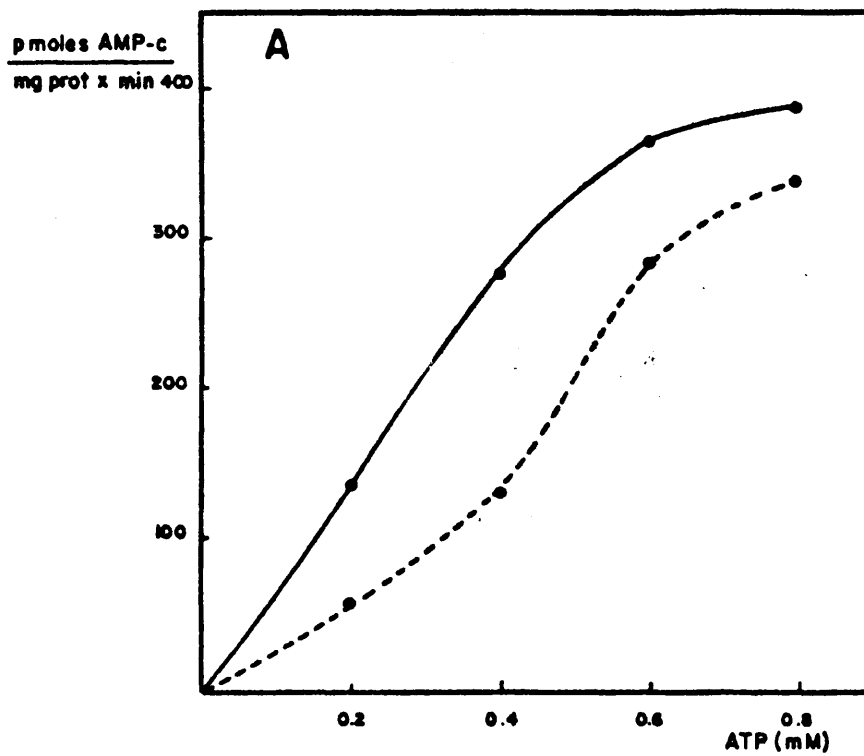


Fig. 34. Efecto de la concentración de ATP sobre la actividad de adenil ciclasa basal (----) y estimulada por NaF 8mM(—), en tejido adiposo (A) e hígado (B) de conejas control. Se mantiene constante la relación $\text{ATP}/\text{Mg}^{+2} = 1/12,5$

4. RESUMEN Y CONCLUSIONES

4. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se ha llevado a cabo un estudio acerca del metabolismo lipídico en conejos centrado en los siguientes aspectos generales:

- Metabolismo lipídico en conejos. Influencia de la gestación y de un estado prolongado de hiperinsulinemia sobre los niveles de lípidos plasmáticos. Relaciones metabólicas materno fetales.
- Composición y estructura de lípidos de hígado y pulmón en conejos e influencias debidas a gestación e hiperinsulinemia prolongada. Estudio de estos aspectos desde el punto de vista de las relaciones materno-fetales, de la propia funcionalidad del órgano y de los mecanismos responsables de su biosíntesis.
- Regulación del metabolismo lipídico en conejos e influencia de las situaciones fisiológicas citadas anteriormente. Estudio "in vitro" de las enzimas de la biosíntesis de ácidos grasos y de la actividad de adenil ciclase en diversos órganos.

Este trabajo ha sido precedido de un estudio bibliográfico sobre los diferentes aspectos relacionados anteriormente.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se deducen las conclusiones que a continuación se resumen:

- 1.- Los niveles de ácidos grasos libres en suero se incrementan notablemente durante la segunda parte de la gestación y disminuyen ligeramente durante el tratamiento con insulina.

Los niveles de triglicéridos se elevan bruscamente a partir de los días 14-17 de gestación, alcanzando un máximo alrededor del día 20, para experimentar de nuevo un ligero incremento al término de la gestación. El tratamiento con insulina no provoca cambios apreciables en los niveles de triglicéridos ni en conejas normales ni en gestantes.

La concentración en suero de fosfolípidos totales experimenta un fuerte descenso durante la segunda mitad de la gestación, siendo la fosfatidilcolina la más afectada por este descenso. La concentración y distribución en clases de fosfolípidos en suero fetal son muy diferentes de los de las madres correspondientes, siendo los aspectos más destacados los elevados niveles de fosfatidilcolina y esfigomielina en suero fetal. El tratamiento con insulina no modifica significativamente los niveles ni la distribución en clases de fosfolípidos tanto en conejas adultas como en fetos.

Los niveles de colesterol total en suero sufren un notable descenso durante la gestación, pero no se alteran con el tratamiento con insulina ni en conejas normales ni en gestantes.

La distribución de lipoproteínas de suero en conejas gestantes muestra un desplazamiento significativo hacia un incremento relativo de las pre- β -lipoproteínas. Por otra parte, la administración prolongada de insulina provoca un incremento en la relación α /pre- β .

- 2.- El incremento en la secreción de triglicéridos durante la gestación parece ser debido no solamente a un incremento en la captura y utilización por el hígado de los elevados niveles de ácidos grasos libres circun-

lantes, sinó que debe estar también implicada la regulación de la síntesis hepática de ácidos grasos. Por otra parte, el descenso de las lipoproteínas α y β durante la gestación sugiere que el descenso en los niveles de fosfolípidos y colesterol puede ser debido a una mayor utilización de estos metabolitos por los tejidos extrahepáticos y probablemente por la transferencia de estos lípidos maternos al feto.

El descenso en los niveles de ácidos grasos libres provocado por el tratamiento con insulina debe ser consecuencia de los efectos extrahepáticos de la hormona, concretamente su efecto antilipolítico en el tejido adiposo. Como consecuencia de esto, la síntesis hepática de triglicéridos a partir de los precursores del plasma se ve disminuida, por lo que el mantenimiento de los niveles de triglicéridos en suero durante el tratamiento con la hormona se debe probablemente a que ese descenso es compensado por un incremento en la lipogénesis hepática a partir de fuentes endógenas.

- 3.- La gestación modifica la composición normal de ácidos grasos en lípidos totales de hígado, siendo los cambios más destacados el incremento en la proporción relativa de ácido palmítico y el descenso en las de esteárico y linoleico. Estos cambios son debidos a las variaciones en la composición de ácidos grasos de triglicéridos y fosfolípidos; los triglicéridos son responsables de los cambios en las concentraciones relativas de los ácidos grasos saturados palmítico y esteárico, mientras que la disminución del ácido linoleico se debe a los fosfolípidos. Por otra parte, en cada grupo de animales adultos, los ácidos grasos constituyentes de los triglicéridos son más saturados que los de los fosfolípidos.

- 4.- Las variaciones en la composición de ácidos grasos de los lípidos totales de hígado fetal con respecto a los de las conejas control y gestantes se traduce en un valor inferior del grado de insaturación.

Los ácidos grasos de los fosfolípidos de hígado fetal se caracterizan por un valor muy bajo del grado de insaturación, inferior incluso al de los triglicéridos del mismo origen. En cuanto a su composición, su característica principal es la baja proporción de los ácidos grasos poliinsaturados linoleico y araquidónico.

La composición de ácidos grasos de los triglicéridos del hígado fetal es más similar a la del adulto normal que a la del hígado materno.

- 5.- La distribución de ácidos grasos entre las posiciones 1 y 2 de fosfatidilcolina de hígado no se afecta por la gestación.

La relación de ácidos grasos saturados localizados en la posición 1 a los de la posición 2 en fosfatidilcolina es notablemente menor en hígado fetal que en hígado materno.

La relación entre las proporciones de ácido palmítico presentes en la posición 1 a las de la posición 2 de fosfatidilcolina de pulmón es menor que en hígado tanto en conejas control como en gestantes. Esto puede interpretarse en el sentido de que, tal como ocurre en rata, en la formación de dipalmitoil-lecitina en pulmón el mecanismo que actúa primordialmente es un ciclo desacilación-reacilación, mientras que en la formación de moléculas de lecitina que contienen ácido linoleico en hígado predomina un mecanismo de biosíntesis "de novo".

6.- La distribución de ácido palmítico es prácticamente idéntica en fosfatidilcolina de hígado y pulmón de fetos a término, siendo ambas muy similares a la existente en pulmón adulto. Esto está de acuerdo con otros hechos que sugieren que el feto de conejo próximo al término almacena grandes cantidades de dipalmitoil lecitina así como otras lecitinas, incluyendo especies moleculares que son liberadas a la superficie alveolar de los pulmones después del comienzo de la respiración.

7.- La gestación no modifica la distribución de ácidos grasos en fosfatidiletanolamina de pulmón, pero induce un descenso en la relación posición 1/posición 2 para los ácidos grasos saturados 16:0 y 18:0 y los insaturados 18:1 y 18:2 en fosfatidiletanolamina de hígado, debidos respectivamente, a un aumento de sus proporciones en la posición 2 y a un descenso en las de la posición 1.

8.- Los resultados obtenidos en la distribución de ácido palmítico en fosfatidiletanolamina de pulmón fetal apoyan la hipótesis de un mecanismo "de novo" para la síntesis de estos fosfolípidos, en lugar de una acilación de la liso-fosfatidiletanolamina correspondiente, probablemente por carecer de aciltransferasas específicas que permitan la unión a la posición 2 del fosfolípido de una segunda molécula de oleico o esteárico.

Por otra parte, es de destacar la presencia en fosfatidiletanolamina de hígado y pulmón fetales de cantidades significativas de ácidos grasos insaturados de cadena larga, localizados exclusivamente en la posición 2; estos ácidos grasos no han sido detectados en fosfatidilcolina de estos órganos fetales.

9.- La gestación induce cambios en la distribución parcial

de ácidos grasos en triglicéridos de hígado y pulmón con respecto a las conejas control. En hígado, la gestación provoca una mayor especificidad en la localización de ácido palmítico en la posición (1 + 3) y de los ácidos insaturados oleico y linoleico en la posición 2. En pulmón, por el contrario, la gestación induce una menor especificidad en esta distribución parcial de ácidos grasos en triglicéridos. Esta tendencia a igualar la distribución de ácidos grasos entre las posiciones (1 + 3) y 2 se manifiesta también claramente en triglicéridos de pulmón fetal, cuya distribución parcial de ácidos grasos es muy similar a la de los triglicéridos de hígado fetal y de pulmón materno.

Estos resultados indican la participación en hígado adulto y fetal de conejos de un mecanismo de síntesis de triglicéridos que posee una diferente especificidad con respecto a los ácidos grasos constituyentes.

10.-El tratamiento con insulina, en las dosis utilizadas, no provoca cambios en la composición de ácidos grasos ni en su distribución posicional en las distintas fracciones de lípidos de hígado y pulmón en conejos adultos ni en fetos cuyas madres han sido tratadas con la hormona.

11.-La actividad acetil-CoA carboxilasa en hígado es menor en conejas gestantes que en animales control, mostrando el hígado fetal un valor muy bajo de esta actividad enzimática. Por el contrario, el hígado fetal posee la máxima capacidad de síntesis de ácidos grasos a partir de ^{14}C -acetil-CoA.

12.-La administración de insulina durante un período prolongado de tiempo provoca una disminución de la acti-

vidad de acetil-CoA carboxilasa de los tres orígenes estudiados, siendo máximo el descenso correspondiente al hígado adulto control. Por otra parte, este tratamiento con insulina estimula la síntesis de ácidos grasos a partir de ^{14}C -acetil-CoA en hígado de conejas adultas control y gestantes.

- 13.-Los resultados obtenidos de los diversos estudios realizados, sugieren que el sistema predominante en la biosíntesis de ácidos grasos en hígado fetal es un mecanismo de elongación, mientras que en hígado adulto actuaría principalmente un mecanismo de biosíntesis "de novo".

La administración de insulina induce un descenso en la participación del mecanismo "de novo" en la síntesis de ácidos grasos.

- 14.-NADH y NADPH en un intervalo de concentraciones de 0-3 micro mol/ml, incrementan tanto la actividad de acetil-CoA carboxilasa como la biosíntesis de ácidos grasos en hígado control, gestante y fetal.

En los tres órganos estudiados, el efecto activador sobre la biosíntesis de ácidos grasos producido por NADH fué mayor que el debido a NADPH; esta diferencia de activación por ambos nucleótidos reducidos decrece en el orden adulto control, gestante, feto, de acuerdo con la disminución de actividad de acetil-CoA carboxilasa observada en los tres órganos. Este hecho se puede explicar por la existencia de un mecanismo de elongación mitocondrial que utiliza acetil-CoA como sustrato y NADH como donador de hidrógeno.

NADPH ejerce un marcado efecto activador sobre la actividad de acetil-CoA carboxilasa en hígado control

y gestante, pero su activación sobre la enzima del hígado fetal es muy pequeña. En el hígado de las tres procedencias, la presencia de NADH provoca sólo un ligero incremento de la actividad de acetil-CoA carboxiilasa.

15.-El estudio de la influencia de concentraciones relativas variables de NADPH \rightarrow citrato y malonil-CoA-citrato sobre la actividad de acetil-CoA carboxilasa sugiere que el NADPH elimina un cierto efecto inhibidor del malonato, al promover su utilización para la síntesis de ácidos grasos. Este efecto inhibidor del malonil-CoA sobre la acetil-CoA carboxilasa requiere la presencia de la forma de la enzima activada por citrato.

16.-Se estudian las propiedades cinéticas de los sistemas adenil ciclasa en tejido adiposo e hígado en conejos.

Se confirma que la acción provocada por la gestación sobre el metabolismo lipídico en conejos es debida fundamentalmente a modificaciones en el estado hormonal y/o alteraciones en el equilibrio neurovegetativo de varios órganos, a la vez que se discuten las posibilidades de esta incidencia sobre las variaciones experimentales de actividad de adenil ciclasa en tejido adiposo e hígado.

5. BIBLIOGRAFIA

5. BIBLIOGRAFIA.

- AARSKOG, D., en "Clinical and Cytogenetic studies in hypodysplasia". Wilkins Sym., Baltimore, Maryland (1969)
- ABRAHAM, S., Amer J. Clin. Nutr., 23, 1120 (1970)
- ADAM, P.A.J. TERRANO, K., RAIHA, N., Proc. 78th Annual Meeting of American Pediatric Society, Atlantic City (1968)
- AKESSON, B., ELOVSON, J., ARVIDSON, G., Biochim. Biophys. Acta, 210, 15 (1970a)
- AKESSON, B., Biochim. Biophys. Acta, 218, 57 (1970)
- AKESSON, B., ELOVSON, J., ARVIDSON, G., Biochim. Biophys. Acta, 218, 44 (1970b)
- AKINO, T., ABE, M., ARAI, T., Biochim. Biophys. Acta, 248, 274 (1971)
- ALCINDOR, L.G., INFANTE, R., SOLER-ARCILAGA, G., POLONOWSKI, J., Biochim. Biophys. Acta, 306, 347 (1973)
- ALEXANDER, D.P., BRITTON, H.G., Foetal Anton Ciba Found. Symp., 95, (1968a); y J. Physiol., London 196, 27P (1968b)
- ALEXANDER, D.P., BRITTON, H.G., COHEN, N.M., NIXON, D.H., Biol. Neonat., 14, 178 (1969)
- ALLMAN, D.W., HUBBARD, D.D., GIBSON, D.M., J. Lipid Res., 6, 63 (1965)
- ALLRED, J.B., ROEHRIG, K.L., J. Biol. Chem., 248, 4131 (1973)
- ANGEL, A., DESAI, K.S., HALPERIN, M.L., J. Lipid Res., 12, 203 (1971)
- APPLEMAN, M.M., THOMPSON, W.J., RUSSELL, T.R., en Advances in Cyclic Nucleotide Research, vol. 3, ed por P. Greengard y G.A. Robison, Raven Press, New York, p.65 (1973)
- ARTOM, M., Fed. Proc., 27, 457 (1968)
- ASSMANN, G., KRAUSS, R.M., FREDRICKSON, D.S., LEVY, R.I., J. Biol. Chem., 248, 1992 (1973)

- BÄR, H.P., HECHTER, O., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 63, 350 (1969)
- BAKER, N., SCHOTZ, M.C., J. Lipid Res., 8, 646 (1967)
- BALL, E.G., Advan. Enzyme Regul., 4, 1 (1966)
- BALLARD, F.J. HANSON, R.W., J. Lipid Res., 8, 73 (1967)
- BÄR, H.P., HAHN, P., Can. J. Biochem., 49 (1), 85 (1971)
- BAR-ON, H., KOOK, A.I., STEIN, O., STEIN, Y., Biochim. Biophys. Acta, 306, 106 (1973)
- BARAONA, E., LIEBER, C.S., J. Clin. Invest., 49, 769 (1970)
- BARNES, C.G., en Medical Disorders in Obstetric Practice. Ed. Blackwell Oxford. (1965)
- BARTER, P.J., J. Lipid Res., 15, 11, (1974)
- BASSET, J., J. Endocrinology, 50, 59 (1971)
- BEALL, J.R., Amer. J. Obst Gyn., 115, 564, (1973)
- BEARN, J.G., ANTONIS, A., PILKINGTON, T.R.E., J. Endocrinology, 37, 479, (1967)
- BEARN, J.G., KOERSELMAN, J.B., PILKINGTON, T.R.E., Nature, 189, 318, (1961)
- BENGTTSSON, L.P., EJARKE, P.M., Acta. Obstet. Gynec. Scand., 43, 49, (1964)
- BENJAMIN, F., CASPER, D.J., Amer. J. Obst. Gyn., 94, 566, (1966)
- BERGHER, E., KAUNITZ, H., JOSEPH, J., Obst. Gyn., 24, 909, (1964)
- BEWSHER, P.D., TARRANT, M.E., ASHMORE, J., Diabetes, 15, 346, (1966)
- BIEZENSKI, J.J., KIMMEL, B., Proc. Soc. Exp. Biol., 130, 1238, (1969)
- BIEZENSKI, J.J., CARROZZA, J., LI, J., Biochim. Biophys. Acta, 239, 92, (1971)
- BIEZENSKI, J.J., J. Lipid Res., 3, 120, (1962)
- BIRNBAUMER, L., POHL, S.L., KRANS, M.J., RODBELL, M., Adv. Biochem. Psychopharmacol., 3, 185, (1970)
- BIRNBAUMER, L., SUTHERLAND, E.W., J. Biol. Chem., 244, 3468, (1969)
- BJERVE, K.S., FEBS Lett., 17, 14, (1971)

- BJERVE, K.S., *Biochim. Biophys. Acta.*, 270, 348 (1972)
- BJERVE, K.S., *Biocim. Biophys. Acta*, 296, 549 (1973 a)
- BJERVE, K.S., *Biochim. Biophys. Acta*, 306, 396 (1973 b)
- BJORNSTAD, P., BREMER, J., *J. Lipid Res.*, 7, 38 (1966)
- BLEICHER, S.J., O'SULLIVAN, J.B., FREINKEL, N., *New Eng. J. Med.*, 271, 866 (1974)
- BLIGH, E.G., DYER, K.J., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 39, 911 (1959)
- BLOOMFIELD, D.K., BLOCH, K., *J. Biol. Chem.*, 235, 337 (1960)
- BODY, D.R., GRAY, G.M., *Chem. Phys. Lipids*, 1, 254 (1967)
- BODY, D.R., SHORLAND, F.B., GASS, J.P., *Biochim. Biophys. Acta*, 125, 207 (1966)
- BORER, R.C., GLUCK, L., FREEMAN, R.K., KULOVICH, M.V., *Pediat. Res.*, 5, 655 (1971)
- BORTZ, W.M., LINEN, F., *Biochem. Z.*, 56, 658 (1963)
- BREMER, J., GREENBERG, D.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 46, 205 (1961)
- BRICKER, L.A., LEVEY, G.S., *J. Biol. Chem.*, 247, 4914 (1972)
- BRISSON, G.R., MALAISE-LAGAE, F., MALAISE, W., *J. Clin. Invest.*, 51, 232 (1972)
- BRO-RASMUSSEN, BUUS, O., LUNDWALL, F., *Acta Endocr.*, 40, 571 (1962)
- BROSTROM, C.O., CORBIN, J.D., KING, C.A., KREBS, E.G., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68, 2444 (1971)
- BRYSON, M.J., GABERT, H.A., STENCLUVER, M.A., *Amer. J. Obst. Gyn.*, 114, 208 (1972)
- BURTON, D.N., COLLINS, J.M., KENNAN, A.L., PORTER, J.W., *J. Biol. Chem.*, 244, 4510 (1969)
- BUTCHER, R.W., BAIRD, C.E., SUTHERLAND, E.W., *J. Biol. Chem.*, 243, 1705 (1968)
- BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W., *J. Biol. Chem.*, 237, 1244 (1962)
- CAVALLI, D., *Quad. Clin. Ost. Gin.*, 20, 427 (1965)
- CEDARD, L., *Steroids*, 16, 361 (1970)
- CLAUSEN, J., LOU HOC., ANDERSON, H., *J. Neurochem.*, 12, 599 (1965)
- CONNOR, W.E., OSBORNE, J.W., MARION, W.L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 118, 710 (1965)

- CONNOR, W.E., J. Lipid Res. 8, 558 (1967)
- CORBIN, J.D., REIMANN, E.M., WALSH, D.A., KREBS, E.G., J. Biol. Chem., 245, 4849 (1970)
- CORBIN, J.D., BROSTROM, C.O., ALEXANDER, R.L., KREBS, E.G., J. Biol. Chem., 247, 3736 (1972)
- COUTTS, J.R.T., J. Endocrinology, 44, 481 (1969)
- CRYER, A., FOSTER, B., WING, D.R., ROBINSON, D.S., Biochem. J., 132, 833 (1973)
- CSORBA, T.R., MATSUDA, I., KALANT, N., Metab. Clin. Exptl., 15, 262 (1966)
- CUARON, A., GAMBLE, J., MYANT, N.B., J. Physiol., 168, 613 (1963)
- CUNNINGHAM, V.J., ROBINSON, D.S., Biochem. J., 112, 203 (1969)
- CUSHMAN, S.W., HEINDEL, J.J., JEANREANUD, B., J. Lipid Res., 14, 632 (1973)
- CHANG, H.C., SEIDMAN, I., TEEBOR, G., LANE, M.D., Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 682 (1967)
- CHAPMAN, M.J., MILLS, G.L., TAYLAUR, C.E., Biochem. J., 131, 177 (1973)
- CHEZ, R.A., MINTZ, D.H., HUTCHINSON, D.L., Metabolism, 20, 805 (1971)
- CHMERALOVA, M., CHMELAR, M., Eur. J. Biochem., 44, 235 (1974)
- CHU, L.C., Mc INTOSH, D.J., HINCENBERGS, I., WILLIAMS, M.A., Biochim. Biophys. Acta, 187, 573 (1969)
- CHUNG, T.H., VAHOUNY, G.V., TREADWELL, C.R., J. Atheroscler. Res., 10, 217 (1969)
- DAAE, L.N.W., Biochim. Biophys. Acta, 270, 23 (1972 a)
- DAAE, L.N.W., FEBS Lett., 27, 46 (1972b)
- DAAE, L.N.W., Biochim. Biophys. Acta, 306, 186 (1973)
- DANCIS, J., Amer. J. Obst. Gyn., 84, 1749 (1962)
- DANNENBURG, W.N., BURT, R.L., Amer. J. Obst. Gyn., 92, 195 (1965)
- DANNENBURG, W.N., BURT, L.R., LEAKE, N.H., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 115, 504 (1964)

- DAWES, G.S., *J. Physiol.*, 220, 119 (1972)
- DEGRELLE-CHEIMOL, C.L., *Rev. Eur. Etud. Clin. Biol.*, 15, 1072 (1970)
- DEL BOCA, J., FLATT, J.P., *Eur. J. Biochem.*, 11, 127 (1969)
- DEMERS, L.M., GABBE, S.G., *Biochim. Biophys. Acta*, 313, 202 (1973)
- DESAI, K.S., LI, K.C., ANGEL, A., *J. Lipid Res.*, 14, 647 (1973)
- DI AGUSTINE, R.P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43, 311 (1971)
- DILS, R.R., HUBSCHER, G., *Biochim. Biophys. Acta*, 46, 505 (1961)
- DITTMER, J.C., LESTER, R.L., *J. Lipid Res.*, 5, 126 (1964)
- DOE, R.P., ZINNEMAN, H.H., FLINK, E.B., *J. Clin. Endocr. Metab.*, 20, 1484 (1960)
- DOLE, V.P., MEINERTZ, H., *J. Biol. Chem.*, 235, 2595 (1960)
- DONALDSON, W.E., MULLER, N.S., *Can. J. Biochem.*, 49, 563 (1961)
- DORSEY, J.A., PORTER, J.W., *J. Biol. Chem.*, 243, 3512 (1968)
- DRYDEN, F.D., MARCHELLO, J.A., FIGROID, W.C., HALE, W.H., *J. Anim. Sci.*, 36, 19 (1973)
- DUPOIS, G., FAVARGER, P., *Helv. Physiol. Acta*, 21, 300 (1963)
- EATON, R.P., STEINBERG, D., BERMAN, M., *J. Clin. Invest.*, 44, 1042 (1965)
- EATON, R.P., *J. Lipid Res.*, 14, 312 (1973)
- EDLOW, J.B., HUDDLESTON, J.F., LEE, G., *Amer. J. Obst. Gyn.*, 111, 360 (1971)
- EGWIN, P.O., SGOUTAS, D.S., *Amer. J. Clin. Nutr.*, 25, 16 (1972)
- EISEMBERG, S., RACHMILEWITZ, D., *Biochim. Biophys. Acta*, 326, 378 (1973)
- ERBLAND, J.F., MARINETTI, G.V., *Fed. Proc.*, 21, 295 (1962)
- ERBLAND, J.F., MARINETTI, G.V., *Biochim. Biophys. Acta*, 106, 139 (1965)

- EXTON, J.H., LEWIS, S.B., HO, R.J., ROBISON, G.A., PARK, C.
R., Ann. N. Y. Acad. Sci., 185, 85 (1971)
- FABIAN, E., STORK, A., KUCEROVA, L., Amer. J. Obst. Gyn.,
100, 904 (1968)
- FAIN, J.N., SOW, R.O., Am. J. Physiol., 210, 19 (1966)
- FAIRWEATHER, D.V.I., J. Obst. Gyn. Brit. Com., 78, 707 (1971)
- FARQUHAR, J.W., GROSS, R.C., WAGNER, R.M., REAVEN, G.M.,
Lipid Res., 6, 119 (1965)
- FASSINA, G., Life Sci., 6, 825 (1967)
- FAVARGER, P., GERLACH, J., ROUS, S., FEBS Lett., 2, 289
(1969)
- FERRE, F., CEDARD, L., C. R. Acad. Sci. Paris Ser. D.,
274, 2599 (1972)
- FLATT, J.P., BALL, E.G., J. Biol. Chem., 241, 2862 (1966)
- FOLCH, J., J. Biol. Chem., 191, 807 (1951)
- FREDRICKSON, D. S., LEVY, R.I., LEES, R.S., New Engl. J.
Med., 276, 32, 94, 148, 215, 273, (1967)
- FREDRICKSON, D.S., GOTTO, A.M., LEVY, R.I., en The Metabo-
lic Basis of Inherited Disease, ed. por J.B.
Stanburg, J.B. Wyngaarden y D.S. Fredrickson, Mc
Graw-Hill. New York, p. 499 (1972).
- FREINKEL, N., Diabetes, 13, 260 (1964)
- FROESCH, E.R., GINSBERG, J.L., J. Biol. Chem., 237, 3317
(1962)
- FROESCH, E.R., en Handbook of Physiology; section 5:
adipose tissue, Baltimore (1965)
- FROSOLONO, M.F., SLIVKA, S., CHARMS, B.L., J. lipid Res.
12, 96 (1971)
- GABBE, S.G., Amer. J. Obst. Gyn., 114, 540 (1972)
- GARFINKEL, A.S., SCHOTZ, M.C., J. Lipid Res., 13, 63 (1972)
- GARFINKEL, A.S., SCHOTZ, M.C., Biochim, Biophys. Acta,
306, 128 (1973)
- GAUTRAY, J.P., en Reproduction humaine Ed. Masson. Paris
(1968)
- GEMZELL, C.A., FILTEJKERSKJOLD, F., STROM, L., J. Clin.
Endocr. Metab., 15, 537 (1955)

- GIBSON, K.D., WILSON, J.D., UDENFRIEND, S., J. Biol. Chem., 236, 673 (1961)
- GINSBERG, J.L., Z. Ges. Exptl. Med., 139, 101 (1965)
- GLUCK, L., LANDOWNE, R.A., KULOVICH, M., Pediat. Res., 4, 352 (1970)
- GLUCK, L., Pediat. Res., 1, 247 (1967 b)
- GLUCK, L., Pediat. Res., 1, 237 (1967 a)
- GLUCK, L., Amer. J. Obst. Gyn., 109, 440 (1971)
- GLUCK, L., Pediat. Clin. N.A., 19, 325 (1972)
- GLUCK, L., KOLOVICH, M.V., BORER, R.C., BRENNER, P.H., Amer. J. Obst. Gyn., 109, 440 (1971)
- GOLDMAN, P., ALBERTS, A.W., VAGELOS, P.R., J. Biol. Chem., 238, 3579 (1963)
- GONÇALVES, J., FAVARGER, P., ROUS, S., Biochimie, 54, 1049 (1972)
- GROSS, R.C., EIGENBRODT, E.M., FARQUHAR, J.W., J. Lipid Res., 8, 114 (1967)
- GUDSON, J.P., WAITE, B.M., Amer. J. Obst. Gyn., 112, 62 (1972)
- GUCHHAIT, R.B., PUTZ, G.R., PORTER, J.W., Arch. Biochem. Biophys., 117, 541 (1966)
- HAFT, D.E., Am J. Physiol., 213, 219 (1967)
- HAJRA, A.K., AGRANOFF, B.W., J. Biol. Chem., 242, 1074 (1967)
- HALL, C.L., BALL, E.G., Biochim. Biophys. Acta, 210, 209 (1970)
- HALPERIN, M.L., ROBINSON, B.H., Biochem. J., 116, 235 (1970)
- HARADA, N., J. Nutr., 93, 263 (1967)
- HARLAN, W.R., WAKIL, S.J., J. Biol. Chem. 238, 3216 (1963)
- HAVEL, R.J., FELTS, J.M., VAN DUYN, C.M., J. Lipid Res., 3, 297 (1962)
- HAVEL, R.J., J. Clin. Invest., 49, 2017 (1970)
- HEIMBERG, M., WEINSTEIN, I., KOHOUT, M., J. Biol. Chem., 244, 5131 (1969)
- HEINZE, E., ESTEINKE, J., Endocrinology, 88, 1259 (1971)

- HENLY, A.A., *Analyst.*, 82, 286 (1957)
- HEPP, K.D., *Diabetologia*, 1, 484 (1971)
- HERSHFIELD, M.S., NEMETH, A.M., *J. Lipid Res.*, 9, 460 (1968)
- HILL, E.E., HUSBANDS, D.R., LANDS, W.E.M., *J. Biol. Chem.*, 243, 4440 (1968)
- HIRSH, J., FARQUHAR, J.W., AHREUS, E.M., *Amer. J. Clin. Nutr.*, 8, 499 (1960)
- HOLLOWAY, P.W., WAKIL, S.J., *J. Biol. Chem.*, 239, 2489 (1964)
- HOLMAN, R.T., *Acta Chem. Scand.*, 17, 80 (1963)
- HOWARD, C.F. Jr. LOWENSTEIN, J.M., *J. Biol. Chem.*, 240, 4170 (1965)
- HULSMANN, W.C., DOW, D.C., *Biochim. Biophys. Acta*, 84, 486 (1964)
- HUTTUNEN, J.K., STEIMBERG, D., *Biochim. Biophys. Acta*, 239, 410 (1971)
- HUTTUNEN, J.K., STEIMBERG, D., MAYER, S.E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 41, 1350 (1970)
- ILLIANO, G., CUATRECASAS, P., *Science*, 175, 906 (1972)
- ISRAEL, S.L., STROUP, P.E., SELIGSON, H.T., *Obst. Gyn.*, 14, 68 (1959)
- JANSEN, G.R., ZANETTI, M.E., HUTCHISON, C.F., *Biochem. J.*, 102, 870 (1967)
- JONES, D.P., ARKY, R.A., *Metab. Clin. Exptl.*, 14, 1287 (1965)
- JOSIMOVICH, J.B., Mc LAREN, J.A., *Endocrinology*, 71, 209 (1962)
- JOST, A., PICON, L., C.R. Acad. Sci., Paris, 246, 1281 (1958)
- JURAND, J., OLIVER, M.F., *Atherosclerosis*, 11, 141 (1970)
- KANFER, J.N., *J. Lipid Res.*, 13, 468 (1972)
- KANOH, H., OHNO, K., *Biochim. Biophys. Acta*, 306, 203 (1973 a)
- KANOH, H., OHNO, K., *Biochim. Biophys. Acta*, 326, 17 (1973 b)

- KANOH, H., Biochim. Biophys. Acta, 176, 756 (1969)
- KANOH, H., Biochim. Biophys. Acta, 218, 249 (1970)
- KAPLAN, S.L., GRUMBACH, M.M., J. Clin. Endocr. Metab., 24, 80 (1964)
- KARP, W.B., SPRECHER, H., ROBERTSON, A., Biol. Neonate, 18, 341 (1971)
- KARP, W.B., Diss. Abstr. Int., B 32, 130 (1971)
- KATZ, J., LANDAU, B.R., BARTSCH, G.E., J. Biol. Chem., 241, 727 (1966)
- KATZ, J., ROGNSTAD, R., J. Biol. Chem., 241, 3600 (1966)
- KENNEDY, E.P., Fed. Proc., 20, 934 (1961)
- KESSLER, J.I., STEIN, J., DANNACKER, D., NARCESSIAN, P., J. Biol. Chem., 245, 5281 (1970)
- KLEIN, A.W., BECKER, R.F., Amer. J. Obst. Gyn., 115, 842 (1973)
- KLEVIT, H.D., Pediat. Clin. N. Amer., 13, 59 (1966)
- KNIGHT, B.L., ILIFE, J., Biochem. J., 132, 77 (1973)
- KNOPP, R.H., SANDEK, C.D., ARKY, R.A., Endocrinology, 92, 984 (1973)
- KO, H., ROYER, M.E., Anal. Biochem., 20, 205 (1967)
- KONO, T., BARHAM, F.W., J. Biol. Chem., 248, 7417 (1973)
- KORCHINSKY, T., GRIES, F.A., HERBERG, L., Horm. Metab. Res., 2, 185 (1970)
- KORNACKER, M.S., LOWENSTEIN, J.M., Science, 144, 1027 (1964)
- KOTAS, R.V., AVERY, M.E., J. Appl. Physiol., 30, 358 (1971)
- KRAUSS, R.M., WINDMUELLER, H. G., LEVY, R.I., FREDRICKSON, D.S., J. Lipid Res., 14, 286 (1973)
- KREBS, H.A., Advan. Enzyme Regul., 5, 409 (1967)
- KREBS, H.A., Advan. Enzyme Regul., 8, 335 (1969)
- LA ROSA, J.C., LEVY, R.I., WINDMUELLER, H.G., FREDRICKSON, D.S., J. Lipid Res., 13, 356 (1972)
- LANDS, W.E., MERKL, I., J. Biol. Chem., 238, 898 (1963)
- LANE, M.D., EDWARDS, J., STOLL, E., MOSS, J., Vitam. Horm., 28, 345 (1970)

- LANGDON, R.G., J. Biol. Chem., 226, 615 (1957)
- LANGER, T., BILHEIMER, D., LEVY, R.I., Circulation, 42,
III - 7 (1970)
- LANMAN, J.T., Pediatrics, 27, 150 (1961)
- LARON, Z., MANNHEIMER, S., NITZAN, M., Arch. Dis. Child,
42, 24 (1967)
- LEMONS de, R.A., SHERMETA, D.W., KUELSON, J.H., KOTAS, R.,
Ann. Rev. Respir. Dis., 102, 459 (1970)
- LEMONS de, R.A., McLAUGHLIN, G.W., Pediatr. Res., 7, 197
(1973)
- LEONE, V., LEONARDIS de, A., PIERRO di, A., Min. Gin., 10,
276 (1958)
- LIND, T., BILLEWIZ, W.Z., J. Obst. Gyn. Brit. Com., 80,
1033 (1973)
- LO, C., MARSH, J.B., J. Biol. Chem., 5001 (1970)
- LOWENSTEIN, J.M., J. Biol. Chem., 236, 1217 (1961)
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.,
J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)
- LUST, G., LYNEN, F., Eur. J. Biochem., 7, 68 (1968)
- MAJERUS, P.W., ALBERTS, A.W., VAGELOS, P.R., Proc. Nat.
Acad. Sci. USA., 53, 410 (1965)
- MAJERUS, P.W., VAGELOS, P.R., Fed. Proc., 23, 166 (1964)
- MAJERUS, P.W., JACOBS, R., SMITH, M.B., MORRIS, H.P., J.
Biol. Chem., 243, 3588 (1968)
- MAJERUS, P.W., KILBURN, E., J. Biol. Chem., 244, 6254
(1969)
- MALLOV, S., ALOUSI, A.A., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119,
301 (1965)
- MANGOLD, H.K., MALINC, D.C., J. Am. Oil. Chem. Soc., 37,
383 (1961)
- MANNING, R., BRINDLEY, D.N., Biochem. J., 130, 1003 (1972)
- MARGOLIS, S., VAUGHAN, M., J. Biol. Chem., 237, 44 (1962)
- MARSH, J.B., JAMES, A.T., Biochim. Biophys. Acta., 60, 320
(1962)
- MARTIN, D.B., VAGELOS, P.R., J. Biol. Chem., 237, 1787
(1962)
- MARTIN, J.D., MILLS, I.H., Clin. Sci., 17, 137 (1958)

- MARTIN, D.B., VAGELOS, P.R., en "Handbook of Physiology";
section 5: adipose tissue. Baltimore (1965)
- Mc BRIDE, O.W., J. Lipid Res., 5, 453 (1964)
- Mc DONALD, H.J., RIBERO, L.P., Clim. Chim. Acta, 4, 458
(1959)
- Mc KAY, D.G., KAUNITZ, H., Metabolism, 12, 990 (1963)
- MENDENHALL, C.L., J. Lipid Res., 13, 117 (1973)
- MENON, K.M.J., GIESE, S., JAFFE, R.B., Biochim. Biophys.
Acta., 304, 203 (1973)
- MERSMANN, H.J., UNDERWOOD, M.C., BROWN, L.J., Amer. J.
Physiol., 224, 1130 (1973)
- METCALFE, L.E., SCHMITZ, A.A., Anal. Chem., 33, 363 (1961)
- METZ, S.H.M., MULDER, I., VAN DER BERGH, S.G., Biochim.
Biophys. Acta., 306, 42 (1973)
- MILKOVIC, S., MILKOVIC, K., SENCAR, I., PAUNOVIC, J., en
"Progress in Brain Research"; ed. por De Wied y
Wijnen. Elsevier, Amsterdam; vol. 32, p. 71 (1970)
- MILKOVIC, S., MILKOVIC, K., PAUNOVIC, J., Endocrinology,
92, 380 (1973)
- MILNER, R.D.G., LEACH, F.N., ASHWORTH, M.A., Biochim. Biop.
phys. Acta, 304, 225 (1973)
- MILNER, R.D.G., J. Endocrinol., 44, 267 (1969 a)
- MILNER, R.D.G., ASHWORTH, M.A., BARSON, A.J., J. Endocri-
nol., 52, 497 (1972)
- MILNER, R.D.G., ASHWORTH, M.A., BARSON, A.J., Horm. Metab.
Res., 3, 353 (1971)
- MILNER, R.D.G., J. Endocrinol., 43, 119 (1969 b)
- MINTZ, D.H., LEVEN, G.S., SCHEN, K.A., Endocrinology, 92,
614 (1973)
- MINTZ, D.H., CHEZ, R.A., HORGER, E.O., J. Clin. Invest.,
48, 176 (1969)
- MOOKERJEA, S., Can. J. Biochem., 47, 125 (1969)
- MORIKAWA, Y., EGUCHI, Y., HASHIMOTO, Y., Nature, 206,
1368 (1965)
- MORIKAWA, Y., EGUCHI, Y., Endocr. Jap., 13, 189 (1966)
- MOSS, J., LANE, M.D., J. Biol. Chem., 247, 4944 (1972)

- MOSSMAN, H.W., Contrib. to Embryol., 26, 129 (1937)
- MULLICK, S., BAGGA, O., MULLIEK, V., Amer. J. Obst. Gyn., 89, 766 (1964)
- MURPHY, B.E.P., CLARKS, S., Amer. J. Obst. Gyn., 118, 538 (1974)
- NAGAI, J., BLOCH, K., J. Biol. Chem., 240, 3702 (1965)
- NAKANISHI, S., NUMA, S., Eur. J. Biochem., 16, 161 (1970)
- NARAYAN, K.A., Lipids, 5, 156 (1970)
- NELSON, G.H., Amer. J. Obst. Gyn., 112, 827 (1972)
- NESTEL, P.J., Metab. Clin. Exptl., 16, 1123 (1967)
- NESTEL, P.J., AUSTIN, W., Life Sci., 8, 157 (1969)
- NIKKILA, E.A., PIKALISTO, O., 3rd Intern. Sym. Drugs Affecting Lipid Metabolism, Milán (1968)
- NIKKILA, E.A., Adv. Lipid Res., 7, 63 (1969)
- NIKKILA, E.A., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 18, 76 (1966)
- NOBLE, R.C., CHRISTIE, W.W., MOORE, J.H., J.Sci. Food Agric., 22, 616 (1971)
- NOBLE, R.C., STEELE, W., MOORE, J.H., Lipids, 6, 26 (1971)
- NUGTEREN, D.H., Biochim. Biophys. Acta, 106, 280 (1965)
- OCKNER, R.K., JONES, A.L., J. Lipid Res., 11, 284 (1970)
- O'HEA, E.K., LEVEILLE, G.A., J. Nutr., 99, 338 (1969)
- OYE, I., SUTHERLAND, E.W., Biochim. Biophys. Acta., 127, 347 (1966)
- PATTEN, R.L., J. Biol. Chem., 245, 5577 (1970)
- PEARLMAN, W.H., CREPY, O., MURPHY, M., J. Clin. Endocr., 27, 1012 (1967)
- PENHOS, J.C., WU, C.H., LEMBERG., A., DAUNAS, J. BRODOFF, B., SODERO, A., LEVINE, R., Metab. Clin. Exptl., 17, 246 (1968)
- PETERSON, R.R., YOUNG, W.C., Endocrinology, 50, 218 (1952)
- PHILLIPS, G.T., NIXON, L.E., DORSEY, J.A., BUTTERWORTH, P.H.W., CHESTERTON, C.J., PORTER, J.W., Arch. Biochem. Biophys., 138, 380 (1970)
- PICARD, C., Bull. Soc. Roy. Belge Gyn. Obst., 37, 277 (1967)
- PICON, L., J. Physiol (Paris), 60, 275 (1968)

- PITKIN, R.M., VAN ORDEN, D.E., *Endocrinology*, 94, 1247 (1974)
- PLATE, C.A., JOSHI, V.C., SEDGWICK, B., WAKIL, S.J., J. *Biol. Chem.*, 243, 5439 (1968)
- PLOTZ, E.J., *Amer. J. Obst. Gyn.*, 101, 534 (1968)
- POPJAK, G., *J. Physiol.*, 105, 236 (1946)
- POPJAK, G., *Cold. Spring Harbor Sym. Quant. Biol.*, 19, 200 (1954)
- POPJAK, G., BECKMANS., *Biochem. J.*, 547 (1950)
- PORCELLATI, G., ARIENTI, G., PIROTTA, M., GIORGINI, D., *J. Neurochem.*, 18, 1395 (1971)
- PRATT, J.J., DANGERFIELD, W.G., *Clin. Chim. Acta*, 23, 189 (1969)
- QUINTO, P., BOTTIGLIONI, F., ORLANDI, C., en "Metabolismo glicidico e stato puerperale". Ed. Capelli, Bologna (1964)
- RAJN, P.K., REISER, R., *Biochim. Biophys. Acta*, 176, 48 (1969)
- RANDLE, P.J., GARLAND, P.B., NEWSHOLME, E.A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 131, 324 (1965)
- RANDLE, P.J., *Diabetologia*, 2, 237 (1966)
- REAVEN, G.M., HILL, D.B., GROSS, R.C., FARQUHAR, J.W., J. *Clin. Invest.*, 44, 1826 (1965)
- REDGRAVE, T.G., *J. Clin. Invest.*, 49, 465 (1970)
- ROBINSON, J., NEWSHOLME, E.A., *Biochem. J.*, 104, 2 c (1967)
- ROBINSON, J., BRADY, R.O., BRADLEY, R.M., *J. lipid Res.*, 4, 144 (1963)
- ROBISON, G.A., BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W., en *Cyclic AMP Academic Press, New York*, p.286 (1971)
- ROBISON, G.A., BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 139, 703 (1967)
- RODBELL, M., BIRNBAUMER, L., POHL, S. L., KRANS, M.J., en *Proceedings of the IV Capri Conference of Diabetes. Acta Diabetologia Latina*, vol 7. Il Ponte, Milan, p.9 (1970)
- RODBELL, M., BIRNBAUMER, L., POHL, S.L., *J. Biol. Chem.*, 245, 718 (1970)

- ROGERS, C.G., Nutr. Rep. Int., 5, 381 (1972)
- ROGERS, C.G., J. Nutr., 101, 1547 (1971)
- ROGNSTAD, R., KATZ, J., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 55, 1148 (1966)
- ROTHBLAT., G.H., en Growth nutrition and metabolism of cells in culture, Academic Press, London (1972)
- ROUS, S., AUBRY, L., Bull. Soc. Chim. Biol., 52, 411 (1970)
- ROUSER, G., SIAKOTOS, A.N., FLEISCHER, S., Lipids, 1, 8; (1966)
- ROUX, J.F., ROMNEY, S.L., Amer. J. Obst. Gyn., 97, 268 (1967)
- ROUX, J.F., GRIGORIAN, A., TAKEDA, Y., Nature, 216, 819 (1967)
- ROUX, J.F., Trans. Sixth Roch. Tropho. Conf., p.205 (1971)
- ROUX, J.F., MYERS, R.E., Amer. J. Obst. Gyn., 118, 385 (1974)
- ROUX, J.F., Metabolism, 15, 856 (1966)
- RUBENSTEIN, B., RUBENSTEIN, D., Can. J. Biochem., 44, 129 (1966)
- RUDEL, L.L., FELTS, J.M., MORRIS, M.D., Biochem. J., 134, 531 (1973)
- RUDEMAN, N.B., RICHARDS, K.C., VALLES DE BOURGES, V., JONES, A.L., J. Lipid Res., 9, 613 (1968)
- SALAMAN, M.R., ROBINSON, D.S., Biochem. J., 99, 640 (1966)
- SALERNO, D.M., BEELER, D.A., Biochim. Biophys. Acta, 36, 325 (1973)
- SANDBERG, A.A., SLAUNWHITE, W.R., J. Clin. Invest., 38, 1290 (1965)
- SCOTT, T.W., SETCHELL, B.P., BASSETT, J.M., Biochem. J. 104, 1040 (1967)
- SCOW, R.O., HAMOSH, M., BLANCHETTE MACKIE, E.J., EVANS, A. J., Lipids, 7, 497 (1972)
- SCHMIDT, K., KATZ, J., J. Biol. Chem., 244, 2125 (1969)
- SCHWARTZ, J.P., JUNGAS, R.L., J. Lipid Res., 12, 553 (1971)

- SCHWARTZ, J.P., Proc. Roy. Soc. Med. (Suppl.), 61, 123 (1968)
- SEIDMAN, I., HORLAND, A.A., TEEBOR, G.W., Biochim. Biophys. Acta, 146, 600 (1967)
- SIMS, R.P.A., LAROSE, J.A.G., J. Am. Oil Chem. Soc., 39, 232 (1962)
- SINCLAIR, A.J., Can. J. Biochem., 49, 700 (1971)
- SKIDMORE, W.G., J. Lipid Res., 3, 356 (1962)
- SMITH, B.T., TORDAY, T.S., GIROND, C.P.J., J. Clin. Invest. 53, 1518 (1974)
- SMITH, S.T., ABRAHAM, S., Arch. Biochem., 136, 112 (1970)
- SODOYEZ - GOFFAUX, F., SODOYEZ, J.C., FOA, P.P., Diabetes 20, 586 (1971)
- SPELLACY, W.N., GOETZ, F.C., GREENBERG, B.Z., Amer. J. Obst. Gyn., 90, 753 (1964)
- SPELLACY, W.N., BUHI, W.C., Obstet. Gynecol., 39, 852 (1972)
- SPERRY, W.N., en Biochemistry of Brain during early development. Neurochemistry, ed. 2 Thomas, Springfield (1962)
- SPOTO, P., Atti. Soc. It. Ost. Gin., 49, 279 (1962)
- STEINBERG, D., en Progress in Biochemical Pharmacology, ed. por D. Kritchevski, R. Paoletti y D. Steinberg S. Kargel, Basel (1967)
- STEINBERG, D., HUTTUNEN, J.K., en Advances in Cyclic Nucleotide Research, vol. 1, Raven Press, N. York p. 47 (1972)
- STERNBERG, J., Gynec. et Obstet., 59, 187 (1960)
- STEWART, J.E., SCHOTZ, M.C., J. Biol. Chem., 246, 5749 (1971)
- STOFFEL, W., ACH, K.L., Hoop - Seyler's Z. Physiol. Chem., 337, 123 (1964)
- STROUVE - VALLET, C., PASCAUD, M., Biochimie, 53, 699 (1971)
- SUNDLER, R., Biochim. Biophys. Acta., 306, 218 (1973)
- SUNDLER, R., AKESON, B., NILSSON, A., Biochim. Biophys. Acta, 337, 248 (1974)

- SWANNEY, M.J., ASHMORE, J., *Metab. Clin. Exptl.*, 14, 516 (1965)
- SZABO, A.J., LELLIS de, R., GRIMALDI, R.D., *Amer. J. Obst. G* 115, 257 (1973)
- TAENSCH, H.W. Jr., HEITNER, M., AVERY, M.E., *Ann. Rev. Respir. Dis.*, 105, 971 (1972)
- TAKAYASU, K., TADA, T., OKADA, F., YOSHIKAWA, I., *Jap. Circul. J.*, 35, 1059 (1971)
- LEE, D.H., FRUMKIN, S., BALINT, J.A., BEELER, D.A., *Biochim. Biophys. Acta*, 202, 163 (1970)
- TZUR, R., TAL, E., SHAPIRO, B., *Biochim. Biophys. Acta*, 84, 18 (1964)
- VAGELOS, P.R., *Ann. Rev. Biochem.*, 33, 139 (1964)
- VAGELOS, P.R., MAJERUS, P.W., ALBERTS, A.W., LARRABEE, A.R. AILHAUD, G.P., *Fed. Proc.*, 25, 1485 (1966)
- VAN DEN BOSCH, H., BONTE, H.A., VAN DEENEN, L.L.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 98, 648 (1965)
- VAN DEN BOSCH, H., VAN GOLDE, L.M.G., SLOTBOOM, A.J., VAN DEENEN, L.L.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 152, 694 (1968)
- VAN DUYNE, C.M., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 102, 599 (1959)
- VAN DUYNE, C.M., *Amer. J. Obst. Gyn.*, 84, 1069 (1962)
- VAN DUYNE, C.M., *Biol. Neonate*, 9, 115 (1965)
- VAN GOLDE, L.M.G., SCHERPHOF, G.L., VAN DEENEN, L.L.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 176, 635 (1969)
- VAN GOLDE, L.M.G., VAN DEENEN, L.L.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 125, 496 (1966)
- VAUGHAM, M., BERGER, J.E., STEINBERG, D., *J. Biol. Chem.*, 239, 401 (1964)
- VELASCO, M.S.A., BENJAMIN, F., GORDON, H.H., *Amer. J. Obst. Gyn.*, 96, 930 (1966)
- VEREYKEN, J.M., MONTFOORT, A., VAN GOLDE, L.M.G., *Biochim. Biophys. Acta*, 260, 70 (1972)
- VIKROT, O., *Acta Med. Scand.*, 53, 175 (1964)
- VILLEE, C.A., LORING, J.M., *Biochem. J.*, 81, 488 (1961)
- VILLEE, C.A., HAGERMAN, D.D., HOLMBERG, N., *Pediatrics*, 22, 953 (1958)

- VOLPE, J.J., KISHIMOTO, Y., J. Neurochem., 19, 737 (1972)
- WAKIL, S.J., PUGH, E.L., SAUER, F., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 52, 106 (1964)
- WAKIL, S.J., Proc. Int. Congr. Biochem. 5 th 1961, p.3 (1963)
- WAKIL, S.J., GOLDMAN, J.K., WILLIAMSON, I.P., TOOMEY, R.E., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 65, 880 (1966)
- WAKIL, S.J., J. Lipid Res., 2, 1 (1961)
- WEBER, G., Advan. Enzyme Regul., 1, 1 (1963)
- WEINHOLD, P.A., J. Lipid Res., 9, 262 (1968)
- WEST, C.E., PASSEY, R.F., Biochem. J., 102, 58 (1967)
- WHITFIELD, C.R., Brit. Med. J., 2, 85 (1972)
- WIDDOWSON, E.M., Nature, 166, 626 (1950)
- WILLES, R.F., BODA, J.M., Fed. Proc., 27, 496 (1968)
- WILLIAMSON, J.R., GARCIA, A., RENOLD, A.E., CAHILL, G.F.Jr., Diabetes, 15, 183 (1966)
- WILLES, R.F., BODA, J.M., MANNS, J.G., Endocrinology, 84, 520 (1969)
- WINAND, J., FURNELLE, J., CHRISTOPHE, J., Biochim. Biophys. Acta., 152, 280 (1968)
- WINDMUELLER, H.G., SPAETH, A.E., Arch. Biochem. Biophys., 122, 362 (1967)
- WINDMUELLER, H.G., LEVY, R.I., J. Biol. Chem., 243, 4878 (1968)
- WINDMUELLER, H.G., HERBERT, P.N., LEVY, R.I., J. Lipid Res 14, 215 (1973)
- WING, D.R., ROBINSON, D.S., Biochem. J., 106, 667 (1968)
- WISE, E.M., BALL, E.G., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 52 1255 (1964)
- WIT-PEETERS, E.M., Biochim. Biophys. Acta, 176, 453 (1969)
- WOLFE, B.M.J., AHALT, B., BECK, J.C., RUBINSTEIN, D., Can. J. Biochem., 48, 170 (1970)
- YEN, S.S.C., J. Clin. Endocr., 25, 655 (1965)
- YOUNG, J.W., SHRAGO, E., LARDY, H.A., Biochemistry, 3, 687 (1964)
- ZACHMAN, R.D., Abs. Soc. Ped. Res. 39th Annual Meeting, p. 40 (1969)

ZACHMAN, R.D., Biol. Neonate, 20, 448 (1972)

ZAK, B., MOSS, N., BOYLE, A.J., ZLATKIS, A., Anal. Chem.,
26, 776 (1954)

ZILVERSMIT, D.B., J. Lipid Res., 9 , 180 (1968)

ZILVERSMIT, D.B., HUGHES, L.B., REMINGTON, M., J. Lipid Res
13, 750 (1972)